



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**DESARROLLO DE UN PROBIÓTICO A PARTIR DE
BACTERIAS LÁCTICAS COMO PROMOTOR DE
CRECIMIENTO PARA POLLOS**

Tesista: LIC. ANA FLORENCIA MORETTI

Director/a: DRA. MARINA A. GOLOWCZYC

Codirector/a: DRA ANGELA M. LEÓN PELÁEZ

Año: 2020

El presente trabajo, para optar por el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue Desarrollado, conjuntamente, en la Cátedra de Microbiología y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-CCT-CIC-UNLP), bajo la dirección de la Dra. Marina A. Golowczyk y la Dra. Ángela M. León Peláez.

A continuación, se detallan los trabajos científicos y presentaciones en congresos que se realizaron en el transcurso de esta Tesis Doctoral:

Trabajos científicos publicados

- MORETTI, ANA F; GAMBA, RAÚL R; COSTA, MARÍA DO CEU, DE ANTONI, GRACIELA L; LEÓN PELÁEZ, ÁNGELA M. Protective effect of lyophilization on fermentative, microbiological and sensory properties of kéfir. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND PHARMACOLOGY*. 2019; 1(1): 5-11. doi: 10.18689/ijbp-1000102

- CEJAS, LUJÁN; ROMANO, NELSON; MORETTI, ANA; MOBILI, PABLO; GOLOWCZYC, MARINA; GÓMEZ-ZAVAGLIA, ANDREA. Malt sprout, an underused beer by-product with promising potential for the growth and dehydration of lactobacilli strains. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-MYSORE*:: ASSOC FOOD SCIENT TECHN INDIA. 2017 vol.54 n°13. p4464 - 4472. issn 0022-1155.

- MORETTI, ANA F.; GAMBA, RAÚL R.; PUPPO, JORGE; MALO, NORBERTO; GÓMEZ-ZAVAGLIA, ANDREA; PELÁEZ, ÁNGELA LEÓN; GOLOWCZYC, MARINA A. Incorporation of *Lactobacillus plantarum* and zeolites in poultry feed can reduce aflatoxin B1 levels. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-MYSORE*:: ASSOC FOOD SCIENT TECHN INDIA. 2017 vol. n°. p1 - 6. issn 0022-1155.

- GAMBA, RAÚL RICARDO; CARO, CARLOS ANDRÉS; MARTÍNEZ, OLGA LUCÍA; MORETTI, ANA FLORENCIA; GIANNUZZI, LEDA; DE ANTONI, GRACIELA LILIANA; LEÓN PELÁEZ, ÁNGELA MARÍA. Antifungal effect of kefir fermented milk and shelf life improvement of corn arepas. *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY*. Amsterdam: ELSEVIER SCIENCE BV. 2016 vol.235 n°. p85 - 92. issn 0168-1605.

Presentación a Congresos

- *Nombre del evento*: XV Congreso Argentino de Microbiología (CAM), XIV Congreso Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE), V Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos (CAMA) y V Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos (CLAMME).

País: Argentina

Año: 2019

Modo de participación: Presentador de póster, Asistente

Tipo de evento: Congreso

Alcance geográfico: Internacional

Institución organizadora: Asociación Argentina de Microbiología (AAM)

Ciudad: Buenos Aires

Información adicional: se presentó el trabajo denominado "AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LACTOBACILOS DE ORIGEN AVIAR"

- *Nombre del evento:* II Congreso Internacional de Zoonosis. IX Congreso Argentino de Zoonosis. Alimentos y Zoonosis: desafíos del XXI

País: Argentina

Año: 2018

Modo de participación: Presentador de póster, Asistente

Tipo de evento: Congreso

Alcance geográfico: Internacional

Institución organizadora: ASOCIACIÓN ARGENTINA DE ZONOSIS

Ciudad: Buenos Aires

Información adicional: se presentó el trabajo denominado "Inhibición de *Salmonella enterica in vitro* en presencia de bacterias lácticas"

- *Nombre del evento:* 8° Ciclo de Conferencias Técnicas en Avicultura 2017- Módulo: Aditivos y Gestión

País: Argentina

Año: 2017

Modo de participación: Conferencista

Tipo de evento: conferencias

Alcance geográfico: Nacional

Institución organizadora: ESTACION EXPERIMENTAL AGROPECUARIA CONCEPCION DEL URUGUAY- CENTRO REGIONAL ENTRE RIOS; INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA

Ciudad: Concepción del Uruguay

Información adicional: El título de la charla fue "Aditivos en avicultura: incorporación de probióticos y compuestos inorgánicos en la alimentación"

- *Nombre del evento:* International Workshop on Advances of Probiotics for Food and Veterinary Applications

País: Brasil

Año: 2016

Modo de participación: Conferencista, Presentador de póster

Tipo de evento: Workshop

Alcance geográfico: Internacional

Institución organizadora: FACULTAD DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS,
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CAMPINAS

Ciudad: Campinas

Información adicional: el resumen titulado "Study of the addition of a probiotic strain isolated from kefir to poultry feed" fue escogido para la presentación oral y el trabajo titulado "Microbial Fraction of kefir (MFK) supplemented whit *Lactobacillus plantarum* (CIDCA83114, CIDCA8316, CIDCA8329 and CIDCA8346) (sLP) as suplement probiotic in drinking water for broilers" fue elegido como póster.

- *Nombre del evento:* Reunión de Coordinación CYTED RED 115RT0488: RED IBEROAMERICANA INTERDISCIPLINARIA E INTERSECTORIAL PARA EVALUAR LA INOCUIDAD DE ALIMENTOS DE ORIGEN AVÍCOLA DESDE LA PRODUCCIÓN PRIMARIA HASTA EL PRODUCTO FINAL. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE ESTRATEGIAS PARA MITIGAR RIESGOS Y GARANTIZAR LA TRANSFERENCIA (IBERO-AVICOLA)

País: Argentina

Año: 2016

Modo de participación: Conferencista, Asistente

Tipo de evento: encuentro

Alcance geográfico: Nacional

Institución organizadora: UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA (UNLP)
CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO EN CRIOTECNOLOGIA DE ALIMENTOS (CIDCA); (CONICET - PROVINCIA DE BUENOS AIRES - UNLP)
RED CYTED

Ciudad: La Plata

Información adicional: El trabajo presentado en esta reunión se tituló "Addition of a freeze-dried probiotic strain isolated from kefir to poultry feed", trabajo realizado en conjunto con la empresa Diagramma S.A.

- *Nombre del evento:* "Trabajo Interdisciplinario para elaboración de alimentos inocuos en el marco de la Economía Social"

País: Argentina

Año: 2016

Modo de participación: Conferencista, Miembro del comité organizador, Asistente

Tipo de evento: Taller

Alcance geográfico: Internacional

Institución organizadora: UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA (UNLP)
CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO EN CRIOTECNOLOGIA DE
ALIMENTOS (CIDCA); (CONICET - PROVINCIA DE BUENOS AIRES - UNLP)

Ciudad: La Plata

Información adicional: el objetivo principal de taller fue generar un taller-debate donde diferentes actores sociales como productores de las PUPAS (Pequeñas Unidades Productivas Alimenticias) y miembros de los programas de extensión de la Facultad de Ciencias Exactas (FCE-UNLP), la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF-UNLP), del Consejo Social de la UNLP, de la Municipalidad de La Plata y de otros países integrantes de la RED CYTED (Portugal y Guatemala) presenten sus experiencias de trabajo en el mejoramiento de la producción artesanal de alimentos. Relacionar las actividades que se desarrollan individualmente con el marco de trabajo de la red CYTED en cuanto a la inocuidad de productos del sector Aviar.

Presentación del trabajo realizado por la Cátedra Libre en Salud y Derechos Humanos y Programa de Extensión en Alimentos y Salud de la FCE, como integrante del equipo de trabajo. Articulando extensión, docencia e investigación en la producción de alimentos. Ponentes: Dra. Ángela León, Dr. Raúl Gamba, Lic. Lina Merino, Lic. Ana Moretti, Lic. Carolina Valiente, Lic. Sofía Sampaolesi y Est. Carlos López Fino.

Trabajos en eventos científico-tecnológicos no publicados

-ESCUDERO, EZEQUIEL; BUTLER, TERESA; LEÓN PELÁEZ, ÁNGELA MARÍA; MORETTI, ANA FLORENCIA; CORREA FRANCO, MARIANA. Reporte de géneros bacterianos y micóticos en ambientes odontológicos. Argentina.2016. Congreso. Congreso Internacional 55 años Facultad de Odontología. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Odontología-Universidad Nacional de La Plata

-ESCUDERO, EZEQUIEL; BUTLER, TERESA; LEÓN PELÁEZ, ÁNGELA MARÍA; MORETTI, ANA FLORENCIA; CORREA FRANCO, MARIANA. Beneficios del monopersulfato de potasio como nueva opción desinfectante en la práctica odontológica. Argentina. .2016. Congreso. Congreso Internacional 55 años Facultad de Odontología. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Odontología-Universidad Nacional de La Plata

-MORETTI, ANA FLORENCIA; GAMBA, RAÚL RICARDO; LEÓN PELÁEZ, ÁNGELA MARÍA; DE ANTONI, GRACIELA LILIANA; GOLOWCZYC, MARINA ALEJANDRA. "*Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 liofilizado en alimentación aviar". Argentina. 2016. Congreso. III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de la CIC. Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (CIC-PBA)

Financiamiento y Vinculación Tecnológica

Esta Tesis Doctoral fue realizada en el marco de un Proyecto de Investigación y Desarrollo (PID), promovido por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MyNCYT) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT). El proyecto PID 2014-0049, denominado "Producción de probióticos aviares para la República Argentina", estuvo bajo la dirección de la Prof. Dra. Graciela L. De Antoni (UNLP-CIC). La institución beneficiaria fue la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y la unidad ejecutora fue el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA-CIC-CCT-UNLP). La empresa adoptante del proyecto fue NITRAP Sociedad de Responsabilidad Limitada, junto a Advanced Biotechnology Company Sociedad Anónima.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Plata, a la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme dado la posibilidad de formarme académicamente en una excelente Universidad Pública.

Además, quiero agradecer a todas las personas que, de alguna forma, estuvieron presentes a lo largo de estos años y, sin las cuales, esto no hubiese sido posible:

A mi directora, Marina, por guiarme durante el trayecto de esta Tesis.

A mi co-directora, Gela, por apoyarme científicamente pero, aún más importante, por ayudarme a fortalecerme como persona.

A Graciela De Antoni, por estar siempre dispuesta a ayudarme, a través de sus consejos y conocimientos, además de poder contar con su calidez humana.

A mis compañeros y compañeras de la Cátedra de Microbiología, por las charlas interminables, las risas y la amistad construida durante estos años.

A mis compañeros y compañeras del Programa de Extensión en Alimentos y Salud (PEAS) y de la Cátedra Libre en Salud y Derechos Humanos (CLSDDHH), por los momentos compartidos.

A los integrantes del Laboratorio Micro del CIDCA, por estar siempre dispuestos a ayudarme de forma desinteresada.

A las amigas que encontré en la Facultad, Susu, Cande, Nadia, Lucre, Marian, Ani.

A mis amigas de Lincoln, Dani y Marina.

Y, especialmente, a mi familia: mis papas, mis hermanos y cuñados, por estar siempre presentes a la distancia, apoyarme y hacerme sentir su amor.

A mi abu Elba, por todo su amor.

ÍNDICE

Índice

Introducción General	8
<u>Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros</u>	28
1.1 Objetivos	29
1.2 Materiales y Métodos	30
1.2.1 Material de trabajo inicial	30
1.2.2 Procesamiento de muestras	30
1.2.3 Identificación fenotípica de las cepas	31
- Morfología de colonia	31
- Prueba de catalasa	31
- Tinción Gram y morfología al microscopio	31
1.2.4 Resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal aviar <i>in vitro</i>	32
- Tolerancia a la bilis	32
- Tolerancia al pH estomacal	33
- Resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal (TGI) <i>in vitro</i>	33
1.2.5 Extracción de ADN, identificación molecular y secuenciación	34
A- Extracción de ADN	34
B- Reacción en Cadena la Polimerasa (PCR)	36
C- Secuenciación de los productos de PCR e identificación de los aislados	37
1.2.6 Adhesión a células intestinales Caco-2/TC-7	37
1.2.6.1 Línea celular	37
1.2.6.2 Ensayo de adhesión a células intestinales Caco-2/TC-7	38
1.2.7 Crecimiento en diferentes medios de cultivo	39
1.2.8 Caracterización fenotípica de acuerdo al perfil de fermentación de azúcares	40
1.2.9 Análisis estadístico	41
1.3 Resultados y Discusión	42
1.3.1 Obtención de microorganismos aislados	42
1.3.2 Resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal aviar <i>in vitro</i>	45
- Tolerancia a bilis	46
- Tolerancia al pH estomacal	49
- Resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal (TGI) <i>in vitro</i>	52

1.3.3 Extracción de ADN, identificación molecular y secuenciación	55
1.3.4 Ensayo de adhesión a células intestinales Caco-2/TC-7	61
1.3.5 Crecimiento en diferentes medios de cultivo	63
1.3.6 Caracterización fenotípica de acuerdo al perfil de fermentación de azúcares	73
1.4 Conclusiones	79
<u>Capítulo 2: Actividad antimicrobiana de <i>Lactobacillus</i> y <i>Enterococcus</i> seleccionados sobre <i>Salmonella in vitro</i></u>	81
2.1 Objetivos	82
2.2 Materiales y Métodos	83
2.2.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	83
2.2.2 Línea celular	84
2.2.3 Estudio de los cultivos completos y los SLC de los aislados de <i>Lactobacillus</i> frente a <i>Salmonella enterica in vitro</i>	84
2.2.4 Actividad inhibitoria de los sobrenadantes libres de células (SLC) de los aislados: porcentaje de reducción del crecimiento	85
2.2.5 Determinación de la composición de ácidos orgánicos débiles en los sobrenadantes libres de células de los aislados	86
2.2.5.1 Determinación de la concentración de ácidos orgánicos no disociados	87
2.2.6 Efecto de los lactobacilos sobre la asociación e invasión de <i>Salmonella</i> a células Caco-2/TC-7	88
a. Coincubación entre el patógeno y los lactobacilos	88
b. Preincubación de las células con los lactobacilos	89
2.2.7 Efecto de los lactobacilos sobre la formación de biofilm de <i>Salmonella</i>	91
2.2.8 Análisis estadístico	91
2.3 Resultados y Discusión	92
2.3.1 Efecto de los cultivos completos y los SLC de los aislados de <i>Lactobacillus</i> frente a <i>Salmonella enterica in vitro</i>	92
2.3.2 Actividad inhibitoria de los sobrenadantes libres de células (SLC): porcentaje de reducción del crecimiento	102
2.3.3 Determinación de la composición de ácidos orgánicos de los sobrenadantes libres de células de los aislados	117
2.3.3.1 Cálculo de la concentración de ácidos orgánicos no disociados	121
2.3.4 Efecto de los lactobacilos sobre la asociación e invasión de <i>Salmonella</i> a células Caco-2/TC-7	124

2.3.5 Efecto de los lactobacilos sobre la formación de biofilm de <i>Salmonella</i>	128
2.4 Conclusiones	130
<u>Capítulo 3: Selección de aislados para formular el producto probiótico y su evaluación en pollos</u>	133
Objetivos	134
Materiales y Métodos	135
3.2.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	135
3.2.2 Selección de aislados para el ensayo <i>in vivo</i>	135
3.2.2.1 Crecimiento en MRS suplementado con permeado de suero	135
3.2.2.2 Viabilidad durante el almacenamiento a temperatura de refrigeración	135
3.2.3 Selección y caracterización de los aislados seleccionados para formular el producto probiótico	136
3.2.3.1 Crecimiento en MRS formulado a partir de cada componente	136
3.2.3.2 Viabilidad durante el almacenamiento a temperatura de congelación	136
3.2.3.3 Estabilidad durante ciclos consecutivos de congelación/descongelación	136
3.2.4 Análisis estadístico	137
3.2.5 Administración del producto probiótico a pollos parrilleros	137
3.2.5.1 Preparación del producto probiótico	137
3.2.5.2 Animales empleados y condiciones de crianza	139
3.2.5.3 Sacrificios y toma de muestra	139
3.2.5.4 Administración del producto probiótico a pollos parrilleros: 1° ensayo	140
3.2.5.4.1 Análisis de translocación de microorganismos en hígado	140
3.2.5.4.2 Análisis histopatológico de intestino	140
3.2.5.4.3 Determinación de microorganismos en el contenido intestinal	141
3.2.5.4.4 Pesaje de animales	142
3.2.5.4.5 Análisis bioquímico de suero	142
3.2.5.4.6 Pesaje de bolsa de Fabricio y bazo	142
3.2.5.4.7 Análisis estadístico	142
3.2.5.5 Administración del producto probiótico a pollos parrilleros: 2° ensayo	143
3.2.5.5.1 Determinación del contenido de materia grasa total en hígado	143
3.2.5.5.2 Análisis histopatológico de intestino	143
3.2.5.5.3 Determinación de microorganismos en el contenido intestinal	143
3.2.5.5.4 Pesaje de animales	143
3.2.5.5.5 Pesaje de bolsa de Fabricio y bazo	144

3.2.5.5.6 Análisis estadístico	144
3.3 Resultados y Discusión	145
3.3.1 Selección de aislados para ensayos <i>in vivo</i>	145
3.3.1.1 Crecimiento en MRS suplementado con permeado de suero	146
3.3.1.2 Viabilidad durante el almacenamiento a temperaturas de refrigeración	148
3.3.2 Selección de los aislados para formular el producto probiótico	149
3.3.3 Caracterización de los aislados seleccionados para formular el producto probiótico	151
3.3.3.1 Crecimiento en MRS formulado a partir de cada componente	152
3.3.3.2 Viabilidad durante el almacenamiento a temperaturas de congelación	154
3.3.3.3 Estabilidad de los aislados durante ciclos consecutivos de congelación/descongelación	155
3.3.4 Administración del producto probiótico a pollos parrilleros	157
<u>3.3.4.1 Administración del producto probiótico a pollos parrilleros: 1° ensayo</u>	159
3.3.4.1.1 Disposición de los animales respecto al galpón	160
3.3.4.1.2 Análisis de la translocación de microorganismos en hígado	161
3.3.4.1.3 Análisis histopatológico del duodeno	164
3.3.4.1.4 Determinación de microorganismos en el contenido intestinal	170
3.3.4.1.5 Pesaje de animales	172
3.3.4.1.6 Determinación de parámetros bioquímicos en suero	176
3.3.4.1.7 Pesaje de bolsa de Fabricio y bazo	178
3.3.4.1.8 Conclusiones del 1° ensayo	180
<u>3.3.4.2 Administración del producto probiótico a pollos parrilleros: 2° ensayo</u>	180
3.3.4.2.1 Disposición de los animales respecto al galpón	182
3.3.4.2.2 Inspección general y necropsias	183
3.3.4.2.3 Determinación del contenido de materia grasa total en hígado	183
3.3.4.2.4 Análisis histopatológico de intestino	184
3.3.4.2.5 Determinación de los microorganismos en el contenido intestinal	188
3.3.4.2.6 Pesaje de animales	188
3.3.4.2.7 Pesaje de bolsa de Fabricio y bazo	192
3.3.4.2.8 Conclusiones del 2° ensayo	193
3.4 Conclusiones	194
<u>Capítulo 4: Evaluación de la dosis infectiva mínima de <i>Salmonella enterica</i></u>	197

4.1 Introducción y Objetivo	198
4.2 Materiales y Métodos	199
4.2.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	199
4.2.2 Preparación del inóculo de <i>Salmonella</i>	199
4.2.3 Animales empleados y condiciones de crianza	199
4.2.4 Inoculación, sacrificios y toma de muestra	200
4.2.5 Observación de lesiones sistémicas características de infección por <i>Salmonella</i>	200
4.2.6 Análisis histopatológico de intestino e hígado	200
4.3 Resultados y Discusión	202
4.3.1 Observación de lesiones sistémicas características de infección por <i>Salmonella Gallinarum</i>	202
4.3.2 Análisis histopatológico de intestino e hígado	209
4.4 Conclusiones	213
Discusión General y Perspectivas	215
Apéndices	221
Referencias Bibliográficas	236
Anexos	271
Anexo 1: Incorporación de <i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114 y zeolita en alimentación aviar	272
Anexo 2: Variaciones en la microbiota intestinal: evaluación por Real Time PCR	274
Anexo 3: Constancia de aprobación de los protocolos de utilización de animales expedidos por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Exactas-UNLP	292

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Panorama nacional de la producción aviar

La industria avícola, tanto a nivel nacional como internacional, ha tenido un marcado crecimiento durante los últimos 20 años. De acuerdo a indicadores históricos, en el período 2000 - 2015, el consumo interno aparente de carne aviar en Argentina se duplicó, instalándose como la segunda carne más consumida con el 42,3 % del consumo cárnico *per cápita*, llegando a posicionarse a la fecha como el cuarto país con el mayor consumo de carne aviar a nivel mundial, luego de Estados Unidos, Uruguay e Israel (Ministerio de Agroindustria, 2018; Ministerio de Hacienda, 2019).

Argentina ocupa el décimo lugar en cuanto a la producción de carne avícola y la exportación a nivel mundial. De acuerdo a datos preliminares, durante el período Enero - Diciembre 2019, la producción de carne aviar estimada a partir de la faena en establecimientos con habilitación nacional, provincial y municipal alcanzó 2.202 miles de toneladas, creciendo en un 6,4 % más que en el mismo período del año 2018. Lo mismo ocurrió con el valor de faena (miles de cabezas), el cual demostró un aumento del 6,4 %, respecto al año anterior. Estos valores fueron impulsados por el crecimiento del consumo interno y de las exportaciones, siendo la industria cárnica con el comportamiento más dinámico de los últimos años. Adicionalmente, se determinó un aumento del 2 % en el consumo aparente durante el mismo período (43,17 Kg / hab / año), respecto al 2018.

En cuanto a las exportaciones e importaciones, hubo un marcado aumento del 35,5 %, mientras que las importaciones descendieron un 55,5 %, respecto al año anterior (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2019). La carne aviar argentina cuenta con una buena inserción en los mercados internacionales. Las exportaciones avícolas en el año 2019 se distribuyeron en más de 45 países, de los cuáles China, Alemania, Chile, Israel, Rusia y Hong Kong fueron los principales. Y se esperan todavía aumentos debido a que la peste porcina africana ha generado millones de bajas de cerdos, obligando a China a buscar fuentes alternativas para cubrir sus necesidades proteicas (Bolsa de Comercio de Rosario, 2019). En cuanto a las importaciones, Brasil y, en menor medida, España, Paraguay y Uruguay fueron los principales países a partir de los cuales se importó carne aviar (Ministerio de Hacienda, 2019).

Todos estos valores denotan la importancia que tiene la industria avícola para el desarrollo productivo de nuestro país, la cual presenta grandes posibilidades de expansión, incluyendo la transformación de productos primarios (maíz y soja, fundamentalmente) y generando altas tasas de empleo en zonas rurales y urbanas. Argentina, siendo un país productor de granos por excelencia, está en una situación privilegiada para la elaboración de alimentos económicos para aves. El alimento es una

de las variables directamente relacionadas con las ganancias obtenidas en la cadena de producción avícola, ya que abarca el 70 % del costo total de la producción. Por este motivo, es necesario formular las raciones para proporcionar el balance correcto de energía, proteína y aminoácidos, minerales y vitaminas para el correcto crecimiento de los animales. Si la calidad física del alimento es deficiente, tendrá un efecto negativo sobre el rendimiento del animal (Molfese, 2019). Para nuestro país, es mucho más rentable exportar carne y huevos con un 10 % más de valor agregado que exportar los granos como tales. Por otro lado, la necesidad de proteínas de alto valor nutritivo es cada vez mayor en el mundo. La alta demanda genera una producción intensiva nacional que requiere el control de distintos contaminantes microbianos. Además, la exportación de productos avícolas requiere que éstos contemplen el control de enfermedades que afectan a la salud pública y al comercio internacional.

2. Sanidad aviar y seguridad alimentaria

Uno de los desafíos para lograr una mayor inserción en el mercado internacional es sin duda la mejora de la sanidad aviar. A pesar de que la Argentina posee un buen estándar sanitario general, mejores y mayores controles sanitarios favorecerían la demanda de mercados externos (Ministerio de Hacienda, 2019). Principalmente, se trata de controlar la incidencia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) ligadas, en este caso, a la producción avícola. Si bien la trazabilidad a lo largo de toda la cadena productiva asegura la calidad microbiológica del alimento, es primordial que la prevención de las ETA sea abordada desde la fuente inicial del posible problema, esto es, comenzando desde la crianza de las aves (Gast et al., 2003; Doyle & Erickson, 2011). Las estrategias de intervención en granjas deben pensarse en dos instancias: una dirigida a la reducción de patógenos en el ambiente, y la otra dirigida a la disminución o eliminación de los patógenos en los animales. En referencia a esta última opción, el método más ampliamente utilizado para el control bacteriano es el uso de antibióticos en dosis subterapéuticas (Brooks, 2011). El uso y abuso de antibióticos en animales ha provocado problemas serios en la evolución de los perfiles de resistencia a antibióticos de diferentes bacterias patógenas causantes de ETA. Un claro ejemplo de esta situación ocurre en Canadá, donde se demostró que un aumento registrado en la resistencia a cefalosporinas de patógenos humanos, se correlacionaba con el uso extensivo de estos antibióticos en granjas de cría de pollos (Turnidge 2004; Webster 2009).

Por lo tanto, la seguridad alimentaria se ha convertido en los últimos años en un tema central en la agenda de la industria de alimentos y de los organismos públicos de control a nivel nacional e internacional. Más allá de los esfuerzos realizados por todas las partes

involucradas en el tema, aún se registra un fuerte impacto sobre la salud de la población mundial que involucra fundamentalmente las ETA causadas por diversos microorganismos y toxoinfecciones causadas por hongos. Existe una demanda creciente a nivel global de seguridad alimentaria, en particular apuntando a mecanismos o estrategias de control en los inicios de la cadena de producción y elaboración de producto (Havelaar et al., 2010). De acuerdo a las altas cifras de consumo y comercio exterior puestas en juego en la producción de carne aviar, el foco de las ETA está puesto en aquellas directamente relacionadas con el consumo de productos avícolas contaminados.

La intensificación de la industria avícola en los países en desarrollo y el uso imprudente de antibióticos en los sistemas de producción animal trae aparejados riesgos para la salud pública, debido al aumento de patógenos zoonóticos, como *Salmonella* y *Campylobacter*, y la diseminación de la resistencia a los antibióticos (van den Bogaard & Stobberingh, 1999; Singer et al., 2003; Adji et al., 2019). Adicionalmente, otras enfermedades entéricas de las aves de corral, como la coccidiosis y la presencia de micotoxinas causan enormes pérdidas económicas en la industria avícola (Williams, 1999; Bera et al., 2010; Skinner et al., 2010).

La campilobacteriosis es la enfermedad diarreaica zoonótica más frecuentemente reportada en todo el mundo, con *Campylobacter jejuni* y *C. coli* como los principales agentes causales de la enfermedad (Humphrey et al., 2007; Horrocks et al., 2009; Bolton, 2015), siendo el pollo y los subproductos avícolas los principales alimentos fuente de este patógeno. Generalmente, *Campylobacter* no causa enfermedades en aves adultas y se considera un microorganismo comensal de la microbiota gastrointestinal; por lo que, una vez que coloniza con éxito algunas aves, se disemina rápidamente de forma asintomática por todo el lote y es difícil de rastrear (Horrocks et al., 2009). A pesar de que se han realizado muchos esfuerzos dirigidos a minimizar la contaminación con *Campylobacter* en aves de corral, no existen medidas de intervención efectivas y confiables para reducir el número de bacterias en el intestino de los pollos de engorde.

En cuanto a la coccidiosis, es la enfermedad parasitaria protozoaria más importante de las aves de corral debido a su naturaleza ubicua, su alta tasa de resistencia a los medicamentos anticoccidios y las graves consecuencias económicas para las parvadas infectadas (Williams, 1999). La enfermedad es causada por diversas especies de protozoos de *Eimeria* que, al poseer un ciclo de vida intracelular, producen daño a lo largo de todo el intestino y afectan la productividad del animal (De Franceschi, 2019).

Otra problemática causante de grandes pérdidas en la producción avícola corresponde a la contaminación por hongos y micotoxinas en los alimentos y camas de criaderos de

aves (Filazi et al., 2017). Las micotoxinas son moléculas de bajo peso molecular que pueden resultar tóxicas para los animales. Son producidas como metabolitos secundarios por hongos de diferentes géneros, como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Las aflatoxinas, producidas principalmente por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* (Yin et al., 2008), son las micotoxinas más investigadas ya que se han asociado con toxicidad aguda y carcinogenicidad en humanos y animales. Entre las aflatoxinas, la aflatoxina B1 (AFB1) es la micotoxina más tóxica y se clasifica como carcinógena para los humanos (IARC, 2012).

Respecto a *Salmonella*, las infecciones provocadas por este patógeno producen enfermedades tanto agudas como crónicas en la producción avícola, lo cual se traduce en grandes pérdidas económicas (Herrera, 2018). Estas infecciones tienen gran importancia en la salud pública, siendo las aves de producción los reservorios más importantes causantes de salmonelosis, una de las principales ETA a nivel mundial. Esto lleva a controles rigurosos permanentes sobre los productores, por parte de las autoridades de salud pública, con el objetivo de asegurar la inocuidad de los alimentos derivados de esta producción (Swayne, 2013). En general, se suele dividir a las infecciones por *Salmonella* en tres grupos: pullorosis y tifosis, causadas por *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*, respectivamente; paratífosis, causadas por varios serotipos móviles; y arizonosis, causada por *S. enterica* subsp. *arizonae* (Shivaprasad, 2000; Swayne, 2013). La tifosis y la pullorosis son enfermedades septicémicas que afectan a las gallinas, entre otras aves de producción, cuyos serovares son altamente adaptados al huésped por lo que, raramente, se presenta la enfermedad en humanos (Herrera, 2018). La tifosis es una enfermedad septicémica aguda o crónica que usualmente afecta a las aves adultas (Shivaprasad, 2000; Barrow & Freitas Neto, 2011; Swayne, 2013). Mientras que *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* son serotipos de *S. enterica* específicos de gallinas (Foley et al., 2007), *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, son serotipos causantes de enfermedades paratíficas; bacterias móviles, no específicas de huésped. Los aspectos relativos a la infección, como colonización del tracto digestivo e invasión de órganos internos, varían dependiendo de los serotipos involucrados (Swayne, 2013). Una característica de *S. Gallinarum* que le confiere una gran prevalencia en toda la industria avícola, es su capacidad de sobrevivir por un largo período de tiempo bajo condiciones adversas: se ha demostrado su viabilidad hasta por 3 meses en médula ósea de aves muertas y hasta 148 días en hígados congelados a -20°C; también es capaz de sobrevivir 1 semana en heces infectadas dentro del galpón y hasta 3 semanas en las camas infectadas sin tratar (Orji et al., 2005; Pulido-Landínez, 2017). Inclusive, puede encontrarse y en el medio ambiente de incubadoras con deficientes procesos de limpieza y desinfección. La transmisión de *S. Gallinarum* puede darse a través del huevo, ya sea

de forma vertical o de forma horizontal, a través de huevos fértiles contaminados con materia fecal, donde los pollitos infectados se convierten en una fuente importante de infección para otros pollos en la planta de incubación. De allí que, la llegada de huevos fértiles contaminados a una planta de incubación se convierta en una de las principales fuentes diseminadoras de la enfermedad (Pulido-Landínez, 2017). La resistencia de *Salmonella*, a los antimicrobianos es un tema actual de preocupación pública y ha ganado amplio interés científico en las últimas décadas (Aarestrup, 2015). Por lo tanto, es sumamente importante buscar estrategias que ayuden a disminuir la presencia de *Salmonella* en toda la cadena de producción aviar, a fin de evitar daños a nivel económico y en la salud humana.

3. Usos y consecuencias de los antibióticos en producción aviar

Mucho se ha hablado del uso de los antibióticos como promotores de crecimiento (APC) de animales destinados al consumo humano, del escaso control en su utilización y del riesgo sanitario de dicho uso. Existen numerosos estudios sobre su aplicación en producción de aves de corral y selección de bacterias resistentes (Angulo et al., 2000; Aarestrup, 2000; Butaye et al., 2003; Asai et al., 2005; Diarrassouba et al., 2007; Diarra & Malouin, 2014; Braykov et al., 2016).

El uso de antibióticos en forma indiscriminada produjo la aparición de cepas bacterianas resistentes, proceso que se potenció por la capacidad de transferir dicha resistencia, incluso entre diferentes géneros y especies (Castanon, 2007; Marshall et al., 2011; Skariyachan et al., 2016; Mehdi et al., 2018; Kumar et al., 2019). Aunque las terapias con antibióticos controlan los microorganismos patógenos, también afectan a muchos microorganismos benéficos, originando trastornos en el equilibrio de la microbiota gastrointestinal (Salminen et al., 1998; Torok et al., 2011; Kers et al., 2018; Pluske et al., 2018).

Desde hace décadas, los antibióticos se han suministrado a los animales de granja (bovinos, ovinos, porcinos y aves) junto con la dieta con un doble propósito: prevenir y tratar cuadros bacterianos y, a su vez, favorecer el crecimiento de los animales (Barton, 2000; Sinol Sen et al, 2011; The Pew Charitable Trusts, 2013). El uso de antibióticos, en dosis subterapéuticas en la industria aviar tiene varios beneficios, entre los que se destacan la disminución de la competencia por los nutrientes entre la microbiota nativa y la patógena, el descenso de metabolitos microbianos que afectan el crecimiento y la reducción de patógenos oportunistas y de infecciones subclínicas (Barton, 2000; Dibner & Richards, 2005; Lee et al, 2011; Torok et al., 2011; Singh et al., 2013). El antibiótico *per se* no se caracteriza por poseer funciones promotoras de crecimiento, sino que

genera un efecto indirecto al mantener en concentraciones relativamente bajas a bacterias no benéficas.

4. El rol de la microbiota intestinal en la salud y el rendimiento productivo de pollos broilers

En la Figura 1 (Herrera, 2018) se presenta la totalidad de los órganos que conforman el tracto gastrointestinal de las aves. La microbiota presente a lo largo de todo el tracto varía, en composición y concentración, en cada uno de estos sectores/órganos (Danzeisen et al., 2011; Ballou et al., 2016).

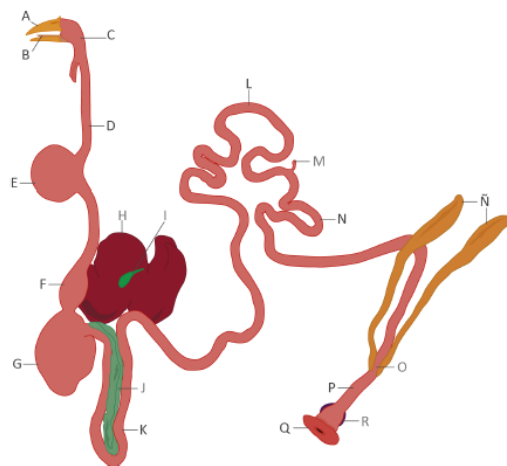


Figura 1. Tracto gastrointestinal de *Gallus gallus domesticus*. A. Pico; B. lengua; C. faringe; D. esófago; E. buche; F. proventrículo; G. ventrículo o molleja; H. hígado; I. vesícula biliar; J. páncreas; K. duodeno; L. yeyuno; M. divertículo de Meckel; N. íleon; Ñ. ciegos; O. tonsilas cecales; P. colon; Q. cloaca; R. bolsa de Fabricio. Imagen extraída de Herrera (2018).

Sin embargo, las poblaciones de bacterias varían según la edad de los pollos y está influenciado por la dieta (Netherwood et al., 1999; Binek et al., 2000), así también como por muchos factores ambientales. Después de la eclosión, la colonización microbiana del tracto digestivo evoluciona muy rápidamente en un proceso denominado sucesión ecológica (Lan et al., 2005). El intestino delgado del pollito recién nacido es inmaduro y su desarrollo requiere cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares. Estos cambios acontecen durante las 2 primeras semanas de vida, y los más trascendentes son los que suceden dentro de las 24 h después del nacimiento (Danzeisen et al., 2011; Londero 2012; Ballou et al., 2016). Especies del género *Lactobacillus* comienzan a colonizar el intestino cuando los polluelos comienzan a alimentarse y se convierten en los organismos dominantes en el buche y el intestino delgado luego de 2 semanas (Guan et al., 2003; Lan et al., 2005). A medida que el animal crece, se establece una

comunidad microbiana cada vez más compleja (Van Der Wielen et al., 2002; Rinttila & Apajalahti, 2013) y cada región desarrolla un perfil microbiano propio, el cual queda completamente desarrollado cerca de los 40 días de edad (Gong et al., 2008; Stanley et al., 2014; Deusch et al., 2015; Kers et al., 2018). Cuando los animales se desarrollan en sistemas de producción extensivos o en forma silvestre, el aparato digestivo es colonizado naturalmente por la microbiota del medioambiente y se genera una simbiosis benéfica con el hospedador (Kurzak et al., 1998; Lutful Kabir, 2009).

El tracto gastrointestinal (TGI) de los pollos contiene bacterias, hongos y protozoos, siendo las bacterias los microorganismos predominantes (Gabriel et al, 2006), con una concentración en el íleon de 10^{8-9} UFC/g y en los ciegos de 10^{10-11} UFC/g (Mead, 1997; Pan & Yu, 2014; Sergeant et al., 2014). Se estima que el TGI de los pollos posee cerca de 10^{13} UFC y que entre el 10 y el 60 % de las bacterias han podido ser cultivadas e identificadas por métodos convencionales (Johansen et al., 2006).

Las principales bacterias en el íleon son *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* mientras que en el ciego prevalecen los microorganismos anaerobios obligados (Lu et al., 2003; Apajalahti et al., 2004; Lan et al., 2005), siendo detectados, en mayor concentración, bacterias de la familia Clostridiaceae (Lu et al., 2003). En los sistemas de cría intensivos, la posibilidad de adquirir la microbiota autóctona natural está fuertemente disminuida, lo que conduce a que el intestino sea fácilmente colonizado por patógenos, entre los que se destacan *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. La presencia de estos patógenos puede desencadenar respuestas inflamatorias, producir infecciones localizadas o sistémicas, o sintetizar toxinas (Londero, 2012). Si consideramos las pérdidas económicas que originan estos microorganismos patógenos en la producción aviar, es evidente el interés que puede motivar la manipulación de la microbiota intestinal como una estrategia para prevenir la colonización de enteropatógenos, así como para promover la salud y el rendimiento productivo de pollos parrilleros (Chambers & Gong, 2011; Baltic et al., 2019; Yadav & Jha, 2019).

5. Alternativas a los antibióticos como promotores de crecimiento

Desde 2006, la Unión Europea instauró la total prohibición del uso de antibióticos como promotores de crecimiento en la alimentación animal (EFSA, 2007); sin embargo, en numerosos países de ingresos bajos y medianos, no existen regulaciones en cuanto a su uso (Van Boeckel et al, 2015). En 2014, los representantes de los países miembros de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), junto con los directores generales de la OMS y la FAO, se reunieron para debatir la manera de enfrentar los desafíos planteados por la amenaza de la resistencia a los agentes antimicrobianos.

Compartiendo la misma preocupación, se encuentra el organismo de Vigilancia Europea del Consumo de Antimicrobianos Veterinarios (ESVAC, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption), el cual recopila información sobre el uso de APC en los diferentes países que lo conforman (ESVAC, 2017).

Siguiendo la tendencia general de los países de Europa, Norteamérica y gran parte del Sureste Asiático, los países de América del Sur, como Brasil, Argentina, Chile y Colombia, se dispusieron a debatir de forma más incisiva sobre el tema de la producción de animales libres de APC. En Argentina, la Secretaría de Promoción y Programas Sanitarios del Ministerio de Salud de la Nación, ha realizado una serie de consultas con expertos en la temática con el fin elaborar un plan integral de acciones que permitan reducir este fenómeno y controlar su impacto negativo.

De estas consultas nace el plan Argentina Innovadora 2020 (Ministerio de Educación, Cultura, Ciencia y Tecnología, MINCyT). El Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (CTI), titulado Argentina Innovadora 2020, hace públicos los esfuerzos del Estado por impulsar el desarrollo inclusivo y la generación de valor en la producción argentina a partir de la CTI. La formulación de este Plan contó con la participación activa de actores del sector productivo y ONGs, científicos, tecnólogos, miembros del MINCyT y de ministerios sectoriales relacionados. El desafío fue identificar los principales rumbos a seguir, manteniendo a la vez espacios de flexibilidad para responder al dinamismo propio del sector, del país, de la región y del mundo; y uno de estos rumbos a seguir es la avicultura.

Siguiendo con la misma línea de trabajo, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA, 2018), bajo la Resolución-594-2015-SENASA, dispuso que “A partir del 2 de enero de 2019 quedan automáticamente dados de baja los registros y certificados de uso y comercialización de alimentos para animales con antibióticos, antiparasitarios o coccidiostáticos, sin perjuicio del cumplimiento de otros plazos que se establezcan por normas que regulen la materia, debiendo cumplirse con el plazo menor”. Adicionalmente, se dispone la baja de los registros de alimentos para animales que contengan antibióticos, entre el 1 de julio del 2020 y 1 de enero del 2022, dependiendo del tipo de antibiótico empleado.

Sumado a la preocupación internacional respecto a su uso, la presencia de residuos de antibióticos en productos de origen animal destinados al consumo humano y en el medioambiente (Carvalho & Santos, 2016; Gonzalez Ronquillo & Angeles Hernandez, 2017) y la demanda emergente del mercado de consumo de productos libres de residuos aditivos, generó la necesidad de buscar alternativas al uso de antibióticos como promotores de crecimiento.

Al inicio de las actividades en producción aviar, el principal objetivo era obtener una mayor tasa de crecimiento y un mejor índice de conversión. Sin embargo, en los últimos años ha adquirido mayor relevancia el bienestar y salud de los animales, poniendo gran atención al medio ambiente y un mayor enfoque hacia las condiciones de alojamiento, composición del pienso y su manejo, donde la utilización de una serie de alternativas a los APC tiene un papel fundamental (Naeem et al., 2018; Yadav & Jha, 2019), sin desatender los beneficios tangibles que los productores avícolas deben percibir. Las alternativas no terapéuticas, que pueden reemplazar (en alguna medida) el uso de los APC son los probióticos, prebióticos, enzimas, ácidos orgánicos, inmunoestimulantes, bacteriocinas, bacteriófagos, fitobióticos, fitocidas, nanopartículas y aceites esenciales. Las sustancias bioactivas, como los prebióticos, fitobióticos, probióticos y simbióticos, tienen la capacidad de modular directamente la microbiota intestinal y afectar indirectamente el organismo del huésped, lo que las convierte en potenciales alternativas a los antibióticos. Estas se utilizan en la producción aviar, suplementadas en agua o alimento, o inyectadas *in ovo* (Attia et al., 2012; Kogut y Arsenault, 2016; Dunislawska et al., 2017).

Los fitobióticos son derivados de plantas, hierbas y especias, utilizadas para mejorar el rendimiento animal. Han tenido mucho éxito debido a sus efectos positivos sobre el crecimiento, la mejora del sistema inmunitario y la reducción de la respuesta al estrés. Los resultados recientes mostraron que estos compuestos son una posible alternativa a los antibióticos (Windisch et al., 2008; Frankic et al., 2009; Toghyani et al., 2011; Ghasemi et al., 2014), promoviendo el crecimiento de los pollos de engorde (Toghyani et al., 2011; Ghasemi et al., 2014, Li et al., 2015). Aunque no se conoce completamente su modo de acción (Wati et al., 2015), se sabe que tienen una gran cantidad de componentes químicos con actividad antibacteriana y antioxidante (Platel y Srinivasan, 2004; Mabona et al., 2013). En los pollos de engorde, su eficacia depende del nivel de inclusión en el alimento y del período fisiológico del pollo (Mountzouris et al., 2011), donde se han observado mejores efectos en la mitad del período de crecimiento y finalizando la crianza. Otra alternativa a los APC son los ácidos débiles orgánicos, los cuales son utilizados como conservantes en la industria alimentaria para proteger el alimento de la proliferación bacteriana y fúngica (Kum et al., 2010). Estos ácidos son principalmente ácidos carboxílicos que llevan un grupo hidroxilo en el carbono alfa, como los ácidos málico, láctico y tartárico. Los ácidos orgánicos también pueden ser ácidos monocarboxílicos simples como los ácidos acético, fórmico, butírico y propiónico. La acción antimicrobiana de los ácidos orgánicos se debe al hecho de que los ácidos no disociados pueden difundirse a través de la membrana de las bacterias lipofílicas e interrumpir las reacciones enzimáticas y el sistema de transporte (Cherrington et al.,

1991). Algunos estudios (Nava et al., 2009; Hassan et al., 2010) demostraron que la adición de ácidos orgánicos a la alimentación de pollos de engorde promueve el crecimiento, la tasa de conversión de los alimentos y la utilización de los mismos. Adicionar ácidos orgánicos en el agua potable les confiere a los pollitos BB una protección eficaz contra la infección por patógenos como *Salmonella* y *E. coli* (Izat et al., 1990; Chaveerach et al., 2004; Dittoe et al., 2018). También se ha encontrado que su consumo genera mejoras en la estructura de la mucosa intestinal de los pollos (Mohammadgheri et al., 2016) y favorece la estabilidad de la microbiota en el intestino (Nava et al., 2009).

También se ha estudiado extensamente el uso de prebióticos en la alimentación para pollos. Estos son polisacáridos y oligosacáridos de cadena corta, no digeribles, de carácter benéfico para la salud del huésped debido a sus propiedades fermentables que estimulan el crecimiento y / o actividad de las bacterias en el íleon y el ciego (Gibson y Roberfroid, 1995). Los prebióticos no son digeribles por el huésped, aunque las bacterias intestinales comensales pueden metabolizarlos para producir ácidos grasos de cadena corta como propionato, acetato y butirato (Józefiak et al., 2008); además de generar cambios en la microbiota cecal, que conllevan beneficios respecto al crecimiento de los animales (Park et al., 2016). Los prebióticos confieren efectos positivos en la productividad avícola, contribuyendo a un tracto intestinal saludable y, de esta forma, postulándose como una buena alternativa a los antibióticos (Zhang et al., 2005; Morales-Lopez et al., 2009,).

6. Probióticos como alternativa a los APC

Los microorganismos probióticos constituyen una alternativa que está siendo extensamente estudiada para disminuir el uso de los APC y, en un futuro cercano, poder sustituir completamente su uso como promotores de crecimiento. Estos se definen como microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del hospedador (FAO/WHO, 2001). Para que un microorganismo sea designado como probiótico debe cumplir una serie de características, de acuerdo a FAO/WHO (2001): ser seguro para el animal, no causar enfermedad ni toxicidad; ser resistente al pH gástrico y a las sales biliares; tener capacidad de permanecer transitoriamente en el intestino para lograr una exclusión competitiva eficaz; tener capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos tanto Gram positivos como Gram negativos. También son importantes sus características tecnológicas, como la estabilidad a procesos de producción, congelación/refrigeración, distribución y almacenamiento. La mayoría de los microorganismos probióticos pertenecen a los

géneros *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* y esporas del género *Bacillus spp.* (Kabir et al., 2004; Mountzouris et al., 2007; Perić et al. 2009; Gaggia et al., 2010; Chaucheyras-Durand & Durand, 2010; Zhang et al., 2018). Al género *Lactobacillus* y *Lactococcus* se lo considera GRAS (*Generally Regarded As Safe*) por la *Food and Drug Administration* (FDA), mientras que los géneros de *Streptococcus* y *Enterococcus* contienen algunas especies oportunistas y patógenas (Salminen et al., 1998).

En aves de corral, las primeras experiencias en la implementación de probióticos fueron realizadas por Nurmi & Rantala (1973). En sus experimentos, se les administró la microbiota de aves adultas sanas a pollitos BB, confiriéndoles una mayor resistencia a la infección por *Salmonella spp.* Al presente, muchos estudios han contribuido con el desarrollo e implementación en el uso de probióticos en la producción avícola (Traldi et al., 2007; Vianna Nunes et al., 2012; Ezema, 2013; Zhang and Kim, 2014; Alagawany et al., 2018; Markowiak & Śliżewska, 2018). A nivel global, la avicultura confía cada vez más en los probióticos debido a la obtención de resultados prometedores en cuanto a sus funciones beneficiosas para el ecosistema intestinal, y la industria de alimentos balanceados está adoptando cada vez más productos probióticos con distintas alegaciones beneficiosas. Se debe hacer mención que, en el mercado actual, hay productos probióticos en venta, pero ninguno es de uso exclusivo para pollos (elaborado a nivel nacional).

7. Mecanismos de acción de los probióticos

El efecto benéfico de los probióticos puede ser atribuido a uno o varios de los siguientes mecanismos de acción:

A) Competencia por la adhesión a receptores del epitelio intestinal y por nutrientes.

Se refiere a la capacidad de los microorganismos probióticos de competir con microorganismos patógenos por nutrientes y por un lugar en la luz intestinal para adherirse exitosamente al epitelio. Los microorganismos probióticos interactúan con los enterocitos, actúan como una barrera defensiva al impedir que el epitelio quede disponible para los patógenos, o crean un ambiente desfavorable para aquellos (Patterson & Burkholder, 2003; Nishiyama et al, 2014). Ciertos microorganismos probióticos pueden expresar sitios de unión a hidratos de carbono complejos, similares

a las adhesinas de la superficie celular que se encuentran en los agentes patógenos potenciales (Neeser et al, 2000).

B) Producción de sustancias antimicrobianas.

Los efectos inhibitorios de las bacterias probióticas sobre los patógenos pueden deberse a la producción de metabolitos como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), diacetilo, bacteriocinas y ácidos orgánicos. El efecto bactericida del H_2O_2 se atribuye a su potente acción oxidante, capaz de destruir componentes celulares esenciales (Requena & Peláez, 1995). En el caso del diacetilo, inhibe el desarrollo de microorganismos Gram negativos al interactuar en el metabolismo de la arginina, impidiendo la utilización de este aminoácido (Jay, 1982).

Las bacteriocinas son péptidos antibacterianos de bajo peso molecular sintetizados en el ribosoma, estables en rangos amplios de pH y resistentes a tratamientos térmicos. Pueden ser activas en contra de bacterias de la misma especie (espectro reducido), o de diferente género (de amplio espectro). Su mecanismo de acción está dirigido a la permeabilización de la membrana (pérdida del potencial de membrana, consumo de reservas energéticas celulares, disminución en la síntesis de DNA, RNA y proteínas) y la lisis celular (Yang et al., 2014).

Los probióticos pueden, además, producir ácidos orgánicos como ácido láctico, acético y propiónico, que acidifican el medio intestinal y crean un ambiente hostil para el desarrollo de microorganismos potencialmente patógenos, los que reducen significativamente su velocidad de multiplicación y mueren al no encontrar un ambiente adecuado (Fuller, 1989). Se ha encontrado evidencia de la acción de ácidos orgánicos producidos por lactobacilos frente a diferentes patógenos como *E. coli*, *S. typhimurium* y *C. perfringens* (Murry et al, 2004; Foltz et al, 2017; Dittoe et al, 2018).

C) Estimulación de la inmunidad innata y específica.

La manipulación de la microbiota intestinal a través de la administración de probióticos puede estimular el sistema inmune de diversas maneras: generando una mayor actividad de macrófagos y una mayor capacidad para fagocitar partículas de microorganismos, incrementando la producción de inmunoglobulinas G y M e interferón γ , y aumentando los anticuerpos locales en las superficies mucosas (IgA) (Ahmad, 2006; Kabir et al, 2004; Molnár et al, 2011; Hill et al, 2014; Shahir et al, 2014; Gao et al, 2017).

8. Efecto de los probióticos en la producción de aves de consumo

Los beneficios de la suplementación con probióticos se han visto reflejados en el rendimiento de pollos de engorde y mejoras de la salud con un aumento en la resistencia a patógenos intestinales tales como *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* (La Ragione et al., 2004; Banjeree & Pradhan, 2006; Higgins et al, 2007a, 2007b, 2008). Este aumento en la resistencia a patógenos ha sido ampliamente estudiado por numerosos autores (Callaway et al., 2008). Ghareeb et al. (2012) estimaron el impacto de un inóculo probiótico constituido por *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Bifidobacterium animalis*, *L. salivarius* y *L. reuteri* sobre *Campylobacter jejuni*. El tratamiento con probiótico redujo significativamente la colonización cecal por *C. jejuni* 8 y 15 días después del desafío. Asimismo, Cao et al. (2012) realizaron un desafío frente a *Clostridium perfringens* y demostraron que *L. fermentum* 2029 era capaz de regular la respuesta inmune de la mucosa intestinal y reducir la inflamación y la gravedad de las lesiones por enteritis necrótica en pollos parrilleros. Con el objetivo puesto en reducir la prevalencia de *Salmonella* en aves, se han publicado varios trabajos que emplean probióticos. Van Coillie et al. (2007) comprobaron que una combinación de *L. reuteri* y *L. johnsonii* administrada previamente en pollos desafiados con *S. Enteritidis*, logró disminuir 10 veces el título de bacterias en células de bazo, hígado y ciego comparado con los controles. Tellez et al. (2001) evaluaron el efecto protector en pollos parrilleros de un suplemento probiótico frente a un desafío con *Salmonella* sp. demostrando que la administración preventiva de este suplemento probiótico permitió disminuir la colonización de hígado, bazo y ciego en los pollos tratados. En otro estudio, un lote de pollos fue tratado con *L. salivarius* y *Streptococcus cristatus* por vía oral luego de haber sido desafiados con una mezcla de *S. Enteritidis*, *S. Kentucky* y *S. Thyphimurium* observándose una reducción en el recuento de *Salmonella* del 41 % comparado con los lotes control (Zhang et al., 2007). Resultados similares fueron hallados por Vila et al. (2009), y Higgings et al. (2007, 2010). Por otro lado, existen numerosos estudios que demuestran que los probióticos pueden aumentar indicadores productivos tales como el incremento de peso vivo y la conversión alimentaria de gallinas ponedoras (Kurtoglu et al., 2004; Yörük et al., 2004 Lan et al., 2003; Sun et al., 2005; Timmerman et al., 2006; Mountzouris et al., 2007; Vicente et al., 2007; Apata, 2008), e incluso mejorar la calidad del huevo (disminución nivel de colesterol, mejora del grosor de la cáscara, aumento del peso) (Kurtoglu et al., 2004; Xu et al., 2006). Esta mejora en los indicadores productivos debido a la administración de probióticos se puede correlacionar con las microestructuras en el intestino, tejido donde ocurre un incremento de la altura de la vellosidades, aumento del número de células por

unidad de superficie y la reducción de la profundidad de las criptas (Cisek & Binek, 2014). Por lo tanto, los probióticos mejoran la morfología del tracto intestinal, que conduce a una mejora en la absorción de los nutrientes, además de la serie de beneficios ya mencionados. Estos aspectos, como son la ganancia de peso corporal, conversión alimenticia (CA), reducción de la mortalidad y factor de eficiencia productiva, serán las características de desempeño que justificarán (o no) un cambio en la práctica de administración de probióticos en las aves de corral.

Entre los efectos que producen las bacterias probióticas se ha descrito, además de la inhibición potencial del patógeno, la capacidad para inmodular (Brisbin et al., 2010; Higgins et al., 2011). Sumado a estos beneficios, el uso de probióticos como promotores de crecimiento en la dieta de los animales no deja residuos en el medio ambiente o en el cuerpo del ave y no causa resistencia cruzada (Nepomuceno & Andreatti, 2000).

Muchos trabajos han demostrado que especies del género *Lactobacillus* producen un desarrollo acelerado de la microbiota intestinal en pollos y pavos, proporcionando una mayor resistencia a infecciones por *Salmonella* spp. (Farnell et al., 2006; Higgins et al., 2007a, 2008, 2010; Vicente et al., 2008). Las bacterias lácticas producen compuestos antimicrobianos, como los ácidos láctico, acético, fenil láctico, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y pueden competir con otras especies acidificando el medio y disminuyendo rápidamente los nutrientes (Gourama & Bulleman, 1995, De Muynck et al., 2004; Gerez et al., 2009, 2013; Cortez-Zavaleta et al., 2014). Aunque el uso de bacterias lácticas ha producido resultados alentadores *in vitro*, este trabajo debe ser extendido *in situ* a sistemas que involucren alimentos de humanos y de animales.

9. Uso de probióticos a escala productiva

Existen resultados que evidencian inconsistencias en el uso de estos productos a escala productiva que han sido contraproducentes para la implementación masiva y de rutina (Willis & Reid, 2008; Bitterncourt et al, 2011; Fajardo et al, 2012).

Estas inconsistencias en la eficacia de los probióticos pueden estar explicadas debido a varias causas.

- El uso incorrecto de las cepas o especies utilizadas.
- La formulación final del preparado (agregado de aditivos, entre otros factores) o los métodos de preparación.
- La supervivencia de los microorganismos probióticos bajo las condiciones medioambientales del tracto digestivo.
- El medio ambiente en donde las aves son criadas.
- El mal manejo en las vías de aplicación del probiótico.

- El estado inmunológico de los animales.
- El linaje del pollo evaluado y su edad y
- El uso concomitante o no de antibióticos en la rutina diaria de cría de animales de engorde (Fox, 1994; Jin et al., 1998).

Rosmini et al. (2004) discute la importancia del aislamiento y selección de probióticos dirigidos a la producción de carne a partir del organismo o alimentos de animales en un ecosistema específico. Este hecho está relacionado con el concepto de co-evolución que es el fenómeno de adaptación evolutiva producida entre dos o varias especies, resultado de su influencia recíproca. Los cambios evolutivos de una especie resultan en una presión sobre el proceso de selección de las otras especies, cuyo resultado a su vez, da lugar a un proceso de contra-adaptación adquirida que influye en el devenir evolutivo de la primera especie (Proctor & Owens, 2000; Thompson 2001; Kwiatkowski et al. 2012). En la comunidad microbiana del tracto gastrointestinal se ve reflejada la co-evolución con su animal hospedador y la dieta adoptada por éste. Así, cambios en la composición de la microbiota pueden tener efectos negativos o positivos en la salud integral del animal (*i.e.*: estado inmunológico, su crecimiento y maduración) (Hill 1982; Yegani & Korver 2008). Teniendo en cuenta el concepto anterior, el uso no selectivo de probióticos podría dar como resultado muy baja o nula eficiencia en el aumento de la producción. Esto ha sido atribuido al uso de probióticos procedentes de diferentes regiones geográficas o incluso de otras especies animales (Rosmini et al., 2004). Por lo tanto, es muy importante que la obtención de microorganismos a ser utilizados como probióticos dirigidos a la producción de carne se realice a partir de aislamientos de animales a los que va a ir dirigido.

Otro factor que puede determinar la capacidad de colonización intestinal de los probióticos es el método de administración, lo cual tiene una injerencia directa sobre el éxito del tratamiento. Las vías de administración más utilizadas en pollos parrilleros son la inclusión en el agua de bebida, la incorporación en los comederos o el agregado a las raciones y la aplicación en dosis individuales. Algunos estudios indican que la vehiculización de los probióticos en el agua de bebida mejora la productividad (Eckert et al., 2010). Sin embargo, algunos pollos recién nacidos se niegan a beber el agua, por lo que el probiótico podría propagarse de manera desigual entre los individuos (Ghadban, 2002; Karimi Torshizi et al., 2010). Eckert et al. (2010) demostraron que la administración de un probiótico formulado con *Lactobacillus* spp. vehiculizado en el agua de bebida y el alimento, incrementa la ganancia de peso en pollos tratados con respecto a los controles. Sin embargo, la administración en alimento pelletizado no fue tan eficaz como el suministro en el agua debido a que las bacterias lácticas se ven afectadas

negativamente por las altas temperaturas empleadas durante el proceso de pelletización (Ghadban, 2002).

La industria avícola es una de las más dinámicas y con mayor expansión a nivel mundial, y el motivo de esta expansión se debe al aporte de una proteína de alta calidad para el consumo humano y de los cortos tiempos de producción. La transición del uso de antibióticos con fines profilácticos/promotores de crecimiento a la implementación de probióticos requiere indefectiblemente que los productores avícolas perciban tangiblemente sus beneficios. Se han mencionado las virtudes que los probióticos poseen en cuanto a la reducción del número de bacterias potencialmente patógenas que pueden llegar a colonizar el tracto intestinal de los pollos de engorde, además de las mejoras en parámetros zootécnicos, como la ganancia de peso. El uso de los probióticos con el fin de disminuir los APC también traería consigo la posibilidad de disminuir la selección de resistencia a los antibióticos entre los microorganismos patógenos y la contaminación en el procesamiento en los mataderos, debido a la disminución de los patógenos asociados al tracto digestivo.

Entonces, de acuerdo a lo expuesto, puede afirmarse que resulta de sumo interés el estudio de microorganismos autóctonos y la evaluación de su capacidad probiótica *in vitro* e *in vivo* como alternativa de suplementación de la dieta de los pollos parrilleros, en pos de mejorar la performance, la sanidad animal y la seguridad de los alimentos que a partir de ellos se obtienen.

Las **hipótesis** de trabajo fueron formuladas a partir de la conjunción de lo expuesto anteriormente y las necesidades surgidas de la industria aviar. Las mismas se enumeran a continuación:

- 1- Existe la posibilidad de aislar microorganismos de diferentes órganos del tracto gastrointestinal de pollos sanos, con propiedades probióticas.
- 2- Es posible cultivar estos microorganismos en sustratos alternativos y económicos.
- 3- Los microorganismos, dentro de sus propiedades probióticas, poseen la capacidad de inhibir enteropatógenos, como *Salmonella* sp.
- 4- La aplicación de los microorganismos probióticos aislados en la alimentación animal permite reducir el uso de antibióticos promotores de crecimiento y obtener una mejora en la productividad.

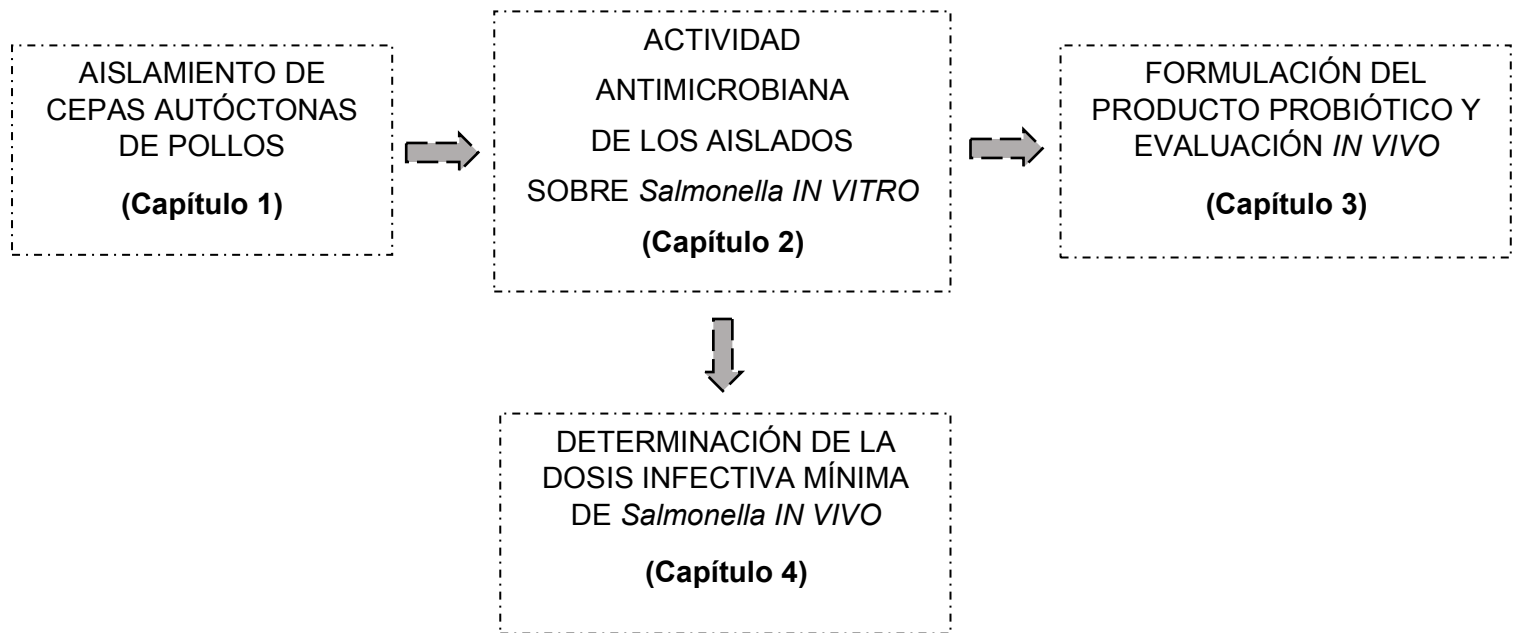
El **objetivo general** de esta tesis fue desarrollar un producto probiótico a partir de bacterias con características probióticas aisladas del tracto gastrointestinal de pollos sanos de una de las principales líneas que se comercializa en el país (COBB 500) para

disminuir/reemplazar el uso de los antibióticos como promotores de crecimiento en la cría de aves de corral.

Cabe mencionar que esta tesis doctoral se realizó dentro del marco del proyecto PID 2014-0049 "Producción de probióticos aviares para la República Argentina". El objetivo central del proyecto PID 2014-0049 fue aislar, identificar y evaluar la capacidad probiótica de bacterias autóctonas del tracto gastrointestinal de pollos, teniendo en consideración su capacidad de inhibir bacterias patógenas (como *Salmonella*), parásitos y hongos toxigénicos presentes en la producción aviar. Adicionalmente, se planteó el estudio de las propiedades tecnológicas de los aislados microbianos, a partir de la evaluación de diferentes formas de preservación a largo plazo. En el marco de este proyecto y a fin de abarcar todos los puntos de vista planteados anteriormente, se realizaron tres tesis doctorales: por un lado, el aislamiento, identificación y caracterización antimicrobiana de los aislados frente a *Salmonella*, desarrollado por quien escribe; por otro lado, el estudio de la capacidad tecnológica de los aislados, realizado por la Ing Agr. Lujan Cejas; y el estudio de la capacidad antifúngica y decontaminante de micotoxinas de los aislados, a cargo de la Lic. Carolina Valiente Dimitruk. Si bien cada una de las becarias desarrolló su tema de forma independiente, todos los resultados fueron puestos sobre la mesa al momento de la toma de decisiones para el avance del desarrollo tecnológico que comprende este proyecto de investigación y desarrollo. Por lo que ciertos resultados / decisiones desarrollados en dichas tesis serán informados a fin de comprender globalmente la toma de decisiones que se fueron realizando al ir avanzando en la investigación.

Esquema de Trabajo

El proceso general de desarrollo de un producto probiótico puede proponerse esquemáticamente, con base en esta tesis, de la siguiente manera:



CAPÍTULO 1

**Aislamiento, caracterización
probiótica e identificación de
bacterias ácido lácticas aisladas a
partir del tracto gastrointestinal de
pollos parrilleros**

1.1 Objetivos

- Aislar e identificar bacterias lácticas nativas de distintas zonas del tracto gastrointestinal de pollos de diferentes edades.
- Estudiar la potencialidad probiótica de las bacterias aisladas mediante ensayos *in vitro*.
- Estudiar la capacidad de las bacterias aisladas de crecer en medios de cultivo alternativos al medio de cultivo tradicional.

1.2 Materiales y Métodos

1.2.1 Material de trabajo inicial

El material de partida fueron 3 pollos de la línea genética COBB, de 10 (1 pollo) y 22 días (2 pollos) de vida. El sacrificio de los animales se realizó, en forma aséptica, el mismo día de su llegada al laboratorio de Investigación de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas-UNLP. Los órganos de partida para realizar el aislamiento fueron buche, yeyuno-íleon y ciegos.

Durante el proceso de aislamiento, se utilizó la siguiente nomenclatura de forma provisoria: para enumerar cada aislado bacteriano, se inició con una letra mayúscula que indicaba el órgano del cual correspondía el aislamiento (B: buche, Y: yeyuno-íleon, C: Ciego), seguido de un número dispuesto en forma consecutiva.

1.2.2 Procesamiento de muestras

A partir buche, yeyuno-íleon y ciegos, se realizó un raspado en esterilidad con espátula estéril y el material obtenido se suspendió en 5 ml de solución fisiológica (NaCl 0,9 % p/v). La suspensión se homogeneizó utilizando un vortex, considerándose ésta la dilución 1/10 y a partir de la misma se realizaron diluciones seriadas 1/100 y 1/1000. De cada dilución, se tomó una alícuota con ansa en anillo y se sembró en superficie por agotamiento en estrías sobre los medios de cultivo agar MRS, agar M17, agar SF y agar MRS suplementado con 6,5 % p/v de cloruro de sodio (NaCl) (**Apéndice I**). Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 horas en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Se seleccionaron colonias de cada placa, de acuerdo a su morfología macroscópica y microscópica (tinción de Gram) y se realizó el pasaje de cada colonia diferente a una nueva placa. Con el objetivo de asegurar la pureza de los aislados, se realizó un 2 ° y 3 ° pasajes por agar MRS, agar M17, agar SF o agar MRS suplementado con NaCl 6,5 % p/v (según corresponda) en las mismas condiciones de incubación (48 horas a 30 °C, exclusivamente en aerobiosis).

Para preservar la colección de microorganismos aislados se realizó el crecimiento a partir de cada colonia aislada, en medio líquido, en incubación a 30 °C por 24 horas. Seguidamente se obtuvo el pellet bacteriano por centrifugación, el cual tuvo dos lavados sucesivos en solución de PBS estéril (**Apéndice I**) y se suspendió en diferentes sustancias crioprotectoras (leche estéril y glicerol 10 % v/v). Estos aislados se

conservaron en la colección de base a -80 °C en el laboratorio de investigación dentro de la Cátedra de Microbiología de la FCE- UNLP.

La activación de los microorganismos congelados se realizó inoculando al 1% v/v en 5 ml del medio de cultivo correspondiente. Transcurridas 24 horas de incubación a 37°C, se repica una vez más, conservando el mismo porcentaje de inóculo e incubando a 37°C por 24 horas. Los inóculos iniciales de trabajo para los ensayos se realizaron a partir del segundo repique, manteniendo la concentración del 1 % v/v respecto al volumen final del medio de cultivo.

1.2.3 Identificación fenotípica de las cepas

- Morfología de colonia

Se observó la forma, el color, la opacidad y la consistencia de las colonias que crecieron en agar MRS, agar M17, agar SF o agar MRS suplementado con NaCl luego de 48 horas de incubación a 30 °C en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis, utilizando una lupa (Nikon, Kogaku, Tokio).

- Prueba de catalasa

En un portaobjetos se homogenizó una porción de colonia con una gota de agua oxigenada, observándose la producción o no de burbujas. La presencia de catalasa se determina por descomposición del peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno, indicando un resultado positivo; de lo contrario, el resultado es negativo (Mac Faddin, 1980).

- Tinción Gram y morfología al microscopio

La morfología de cada colonia se estudió mediante Tinción Gram (Gram, 1884). Se extendió una porción de colonia en el centro de un portaobjeto de vidrio con una gota de agua destilada y se fijó con calor. Se tiñó con la solución cristal-violeta (por dos minutos), se cubrió con Lugol (1 minuto) y se enjuagó con agua destilada. Posteriormente se realizó una decoloración con alcohol/acetona (durante 15 segundos), se enjuagó nuevamente con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Por último, se le adicionó safranina (por dos minutos) y luego se enjuagó con agua destilada. La tinción Gram dependerá del espesor, la estructura física y la permeabilidad de la pared bacteriana. Las bacterias Gram (+) se tiñen de color violeta mientras que las bacterias Gram (-) se tiñen de rosado (Basualdo et al., 2006).

La morfología y coloración se observaron en un microscopio óptico con un objetivo de inmersión 100 X (serie CX21, Olympus).

1.2.4 Resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal aviar *in vitro*

Se evaluaron la tolerancia al pH estomacal y a la bilis, y resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal (TGI) *in vitro*.

Se decidió trabajar con la cepa *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, aislada del gránulo de kefir CIDCA AGK1 y perteneciente al cepario de la Cátedra de Microbiología FCE-UNLP, como cepa de referencia. Esta elección se basó en las siguientes razones: el grupo de investigadoras que forman parte del proyecto PID tienen amplia experiencia en la microbiología de alimentos, particularmente en el estudio de kefir, el cual es un alimento probiótico. Se han constatado las propiedades probióticas de esta bebida, desde su acción antibacteriana y antifúngica, hasta sus propiedades tecnológicas en cuanto a conservación por diferentes metodologías (secado spray, liofilización, etc.), donde las publicaciones más relevantes y las más recientes se mencionan a continuación: Garrote (1999), Golowzyc et al. (2008), Hugo et al. (2008), Golowzyc et al. (2010), Bolla et al. (2010), Kakisu et al. (2012), León Peláez (2013), Gamba (2015) y Moretti et al. (2018). Adicionalmente, aunque el kefir es considerado un alimento de consumo humano, también se ha evaluado su efecto en la producción de pollos parrilleros, tanto del producto completo como bacterias aisladas del mismo, entre las que se encuentra *L. plantarum* CIDCA 83114, de acuerdo a Correa Franco (2018).

-Tolerancia a la bilis

Se estudió la tolerancia a la bilis respecto al crecimiento en placa mediante el método ecométrico modificado, propuesto por Kociubinski et al. (1999). Esta determinación se realizó utilizando bilis de buey deshidratada (Britania, Buenos Aires, Argentina) y bilis fresca extraída de pollo. Para la obtención de bilis fresca, dos animales de 40 días de edad fueron sacrificados en condiciones de esterilidad. El contenido biliar se extrajo de la vesícula biliar con ayuda de una jeringa.

Una alícuota de cada inóculo inicial bacteriano se sembró con ansa en anillo calibrada en estrías consecutivas (sin esterilizar el ansa) sobre una placa de Petri conteniendo 9 ml de agar MRS adicionado de 1 ml de solución de bilis de buey al 5 % p/v o bilis fresca de pollo, esterilizadas por filtración (ver **Figura 1**). La concentración final de bilis en la placa fue de 0,5 % p/v que corresponde al valor encontrado en la región duodenal del tracto intestinal de los pollos (Hidayat et al., 2018). Simultáneamente, se utilizó como control positivo el crecimiento de la bacteria en el mismo medio de cultivo en ausencia

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

de bilis. Las placas de Petri se incubaron a 37 °C durante 24 a 48 horas. Para el análisis de los resultados, se comparó el crecimiento en la placa del control sin bilis respecto al crecimiento en el medio de cultivo con bilis. Se asignó al crecimiento un valor de 1 en la primera estría, de 2 en la segunda, 3 en la tercera, 4 en la cuarta y 5 en la quinta estría. Luego se sumaron los valores obtenidos, siendo 15 el valor máximo, indicio de un alto grado de resistencia a la bilis. En caso de obtenerse un menor crecimiento que en el control sin bilis, se le asignó un valor igual a la mitad del valor correspondiente para un buen crecimiento en dicha estría.

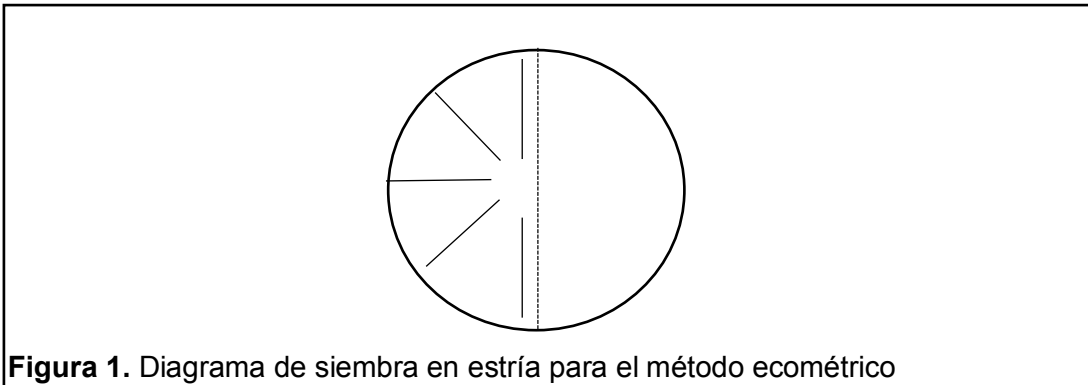


Figura 1. Diagrama de siembra en estría para el método ecométrico

- Tolerancia al pH estomacal

Se evaluó la supervivencia de las cepas en condiciones de acidez (pH 3), durante 2 horas a 41 °C (valores de pH, tiempo y temperatura aproximados de la molleja del pollo) (Maragkoudakis et al., 2006). Se preparó una solución de PBS ajustada a pH 3 con HCl 1N. Se suspendió una alícuota del inóculo inicial bacteriano en esta solución y se incubó por 2 horas a una temperatura de 41 °C en baño termostatzado. Se tomaron alícuotas del cultivo a los tiempos 0, 1 y 2 horas de incubación y se sembró en superficie en medio MRS. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 a 48 horas. La supervivencia se comprobó al comparar el recuento de microorganismos viables obtenidos del inóculo, con las células sobrevivientes después del tiempo máximo de incubación (Gómez-Zavaglia et al., 1998); el porcentaje de resistencia (% R pH) fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación (Kociubinski et al., 1999):

$$\% R \text{ pH} = [(UFC/ml) \text{ MRS pH3} \times 100] / (UFC/ml) \text{ MRS (inóculo)}$$

-Resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal (TGI) *in vitro*

Se utilizó el protocolo modificado según Musikasang et al. (2009). La metodología fue la siguiente:

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

1) A partir de un cultivo de cada bacteria en fase estacionaria, se realizaron dos lavados con PBS y se prepararon 10 ml de suspensión con una concentración entre 1×10^7 UFC/ml y 1×10^8 UFC/ml (DO_{550nm} 0,2).

2) Se centrifugaron y suspendieron en 10 ml de jugo gástrico simulado (ver composición en **Apéndice 1**). Se incubó a 41 °C con agitación (200 rpm) durante 2 horas (tiempo medio de retención en el proventrículo y molleja).

3) Se realizaron dos lavados con PBS, se separó 1 ml para realizar el recuento de microorganismos viables y se suspendió el resto, en 9 ml de jugo intestinal simulado (ver composición en **Apéndice 1**). Se incubó a 41 °C con agitación (200 rpm) durante 6 horas (tiempo medio de retención en el intestino).

4) Se realizaron dos lavados con PBS, y se realizó el recuento de microorganismos viables.

La resistencia se evaluó en términos del recuento de lactobacilos viables en agar MRS, al tiempo inicial (t_0) y posterior a la incubación durante 2 y 8 horas (tiempo total de permanencia en el TGI). Adicionalmente, se expresó como porcentaje de supervivencia (% supervivencia), de acuerdo a la siguiente ecuación:

% Supervivencia = $[\text{Recuento final } (t_8) / \text{recuento inicial } (t_0)] * 100$, donde recuento final (t_8) es la concentración microbiana obtenida luego del pasaje sucesivo por las soluciones gástrica e intestinal simuladas.

1.2.5 Extracción de ADN, identificación molecular y secuenciación

A- Extracción de ADN

Se evaluaron diferentes protocolos para lograr la extracción de ADN de los aislados, los cuales se detallan a continuación:

-Uso de beads (Kalium Technologies SRL)

1) Se tomó una alícuota de 1 ml de un cultivo microbiano overnight y se centrifugó a 13.200 rpm por 4 minutos.

2) El pellet obtenido se suspendió en agua farmacológica estéril y se adicionó 1 punta de espátula de beads, seguido de una incubación en baño termostático a 100 °C durante 1 minuto.

3) La suspensión se homogeneizó con vortex durante 30 segundos e inmediatamente se sumergió en hielo.

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

4) Se centrifugó a 13.200 rpm por 4 minutos y se conservó el sobrenadante a -20 °C hasta el momento de la amplificación.

-Uso de beads previo a la extracción con el kit (Quick Protocol, Wizard® Genomic DNA Purification Kit)

1) Se tomó una alícuota de 1 ml de un cultivo microbiano overnight y se centrifugó a 13.200 rpm por 4 minutos.

2) El pellet obtenido se suspendió en agua farmacológica estéril y se adicionó 1 punta de espátula de beads para favorecer la ruptura mecánica de la pared. Se realizó un pulso de 15 segundos en vortex y posterior centrifugación para eliminarlas.

3) Se continuó con el protocolo especificado según el fabricante del kit de extracción utilizado.

-Uso de resina Chelex® (Sigma-Aldrich)

1) Se tomó una alícuota de 1 ml de un cultivo microbiano overnight y se centrifugó a 13.200 rpm por 4 minutos.

2) El pellet obtenido se lavó con agua miliQ estéril (Genbiotech, USA) y luego se centrifugó a 13.200 rpm por 4 minutos.

3) Se le adicionó una alícuota de la resina quelante Chelex® para favorecer la separación de componentes por intercambio iónico. Se homogeneizó suavemente con un tip.

4) Se incubó en un baño termostático a 56-60 °C durante 20 minutos y se homogenizó en vortex.

5) Nuevamente se incubó en baño termostático a 100 °C durante 8 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 14.000 rpm por 4 minutos y se conservó el sobrenadante a -20 °C hasta el momento de la amplificación.

-Extracción con LiCl (Malamud, 2019)

El LiCl se emplea como desestabilizante de la capa S que poseen ciertos lactobacilos, como *Lactobacillus kefir* aislado de kefir (Garrote et al., 2004).

1) Una alícuota de un cultivo microbiano overnight, se centrifugó a 13.200 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con PBS.

2) Se centrifugó nuevamente y se suspendió en 200 µl de LiCl 5 M.

3) Se homogenizó en vortex durante 5 minutos interrumpiendo a intervalos, para asegurar el contacto entre el LiCl y el material.

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

- 4) Se centrifugó a 8.000 rpm por 5 minutos y se realizó un doble lavado del pellet con PBS, a fin de eliminar el LiCl. El sobrenadante se colocó en una membrana de celulosa con un tamaño de poro de 33 mm y se dializó por 24 horas sumergido en una solución de PBS, a fin de eliminar gradualmente el LiCl. Se centrifugó a 13.000 por 5 minutos y el pellet se suspendió en el buffer de siembra. La presencia de proteínas extracelulares se determinó por la técnica SDS-page.
- 5) El pellet se suspendió en agua farmacológica y se incubó en un baño termostático en ebullición durante 5 minutos.
- 6) Se centrifugó a 8.000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante se conservó almacenado a -20 °C hasta la etapa de amplificación.

B- Reacción en Cadena la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los fragmentos de ADN a secuenciar, se preparó una mezcla inicial de reacción o premix que consta de los reactivos básicos necesarios para la amplificación.

En la **Tabla 1** se presentan, los reactivos necesarios para realizar la amplificación de una muestra con un volumen final de 20 µl, según las indicaciones del proveedor. Los volúmenes varían según el número de muestras y el volumen final deseado. Tanto para la preparación del material como para la manipulación se utilizaron guantes de látex para proteger la muestra de las enzimas que degradan el ADN o de la contaminación con material extraño.

Tabla 1. Composición de la mezcla de reacción para la reacción de PCR. El volumen de muestra de ADN utilizado fue 1 µl.

Reactivos	Volumen (µl)
Buffer taq ^a 10X	0,2
DMSO	0,1
MgCl ₂ ^a (50 mM)	0,6 (3 Mm)
dNTPs ^a (2 mM)	2,0 (0,2 mM)
338F ^b (100 mM)	2,0 (10 mM)
518R ^b (100 mM)	2,0 (10 mM)
Taq polimerasa ^a	0,2 (1 U)
Agua miliQ c.s. ^b	11,9

^aProveedor (Productos Bio-Lógicos, Quilmes, Argentina) ^b proveedor (Genbiotech, USA)

Los oligonucleótidos utilizados son específicos para Eubacterias (518R y 338F), los cuales codifican para la región V3 del ARNr 16S y poseen las siguientes secuencias: 338F (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') y 518R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'). Para determinar la presencia de *Lactobacillus buchneri* y *Lb. kefir* (para los cuales se hizo SDS con el fin de determinar la posible presencia de proteínas de capa S), se

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

realizaron también reacciones de amplificación con los primers Gwi-y-f y TREG-. La reacción de amplificación se llevó a cabo en una termocicladora Agilent technologies® Stratagene Gradient Cycler. El programa de ciclado utilizado fue el siguiente:

- 1- Desnaturalización inicial: 95 °C, 2 minutos.
- 2- Ciclos (n=25) de: Desnaturalización: 95 °C, 30 segundos.
 Annealing: 57 °C, 40 segundos.
 Extensión: 72 °C, 1 minuto.
- 3- Extensión final: 72 °C, 10 minutos.

Se realizó una corrida electroforética de los productos de amplificación en gel de agarosa (1,2 % p/v) con agregado de bromuro de etidio (ver **Apéndice 1**) para constatar que la amplificación fuese exitosa, junto a un patrón de peso molecular de 1000 pb (Genbiotech, USA). Las bandas obtenidas fueron observadas en un transiluminador (Labnet®, DyNA Light Dual intensity UV, Estados Unidos).

C- Secuenciación de los productos de PCR e identificación de los aislados

Los amplicones obtenidos por PCR de los aislados fueron enviados para su secuenciación a Macrogen (Seul, Korea). A partir de las secuencias obtenidas, se obtuvo la secuencia consenso con el programa Bioedit y, posteriormente, se realizó la identificación por comparación con la base de datos del GenBank. Se utilizó el software BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) y se determinó el % de homología con cepas tipo depositadas en diferentes bancos. Su comparación con las secuencias disponibles en las bases de datos públicas permite asignar los aislados a una especie cuando el porcentaje de similitud de sus secuencias es superior o igual a 99 %.

1.2.6 Adhesión a células intestinales Caco-2/TC-7

1.2.6.1 Línea celular

Se utilizó la línea celular humana Caco-2/TC-7 (pasaje 23 a 30). La elección de la línea celular se basó en estudios realizados por otros autores, en los cuales se evaluó la capacidad de adhesión celular de cepas autóctonas de pollos con esta línea, con el objeto de una futura aplicación en producción aviar (Messaoudi et al., 2012; Feng et al., 2016). La composición de los medios de cultivo utilizados para el cultivo de las células se detalla en el Apéndice 2. Las células se mantienen congeladas en nitrógeno líquido en viales de 1 ml de medio DMEM completo, utilizando 5% de dimetilsulfóxido (Riedel-de Haën AG, D-3016 Seelze, Alemania) como crioprotector. Para reactivarlas, se

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

descongeló un vial a 37 °C, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos para retirar el crioprotector, se resuspendieron las células en 1 ml de medio de cultivo fresco, y se cultivaron en una botella de 25 cm² (Corning Costar Co., Cambridge, MA, USA) con 4 ml de medio DMEM completo. El cultivo se mantuvo a 37 °C en estufa con atmósfera controlada (5% CO₂ – 95% aire) cambiando el medio cada 2 días. A los 5-7 días, se obtuvo una monocapa confluyente y se repicó a una botella de 75 cm².

En cada repique la monocapa se observó en un microscopio invertido para verificar la uniformidad y continuidad de la monocapa. Los repiques se realizaron de la siguiente manera: se descartó el medio ya agotado y se lavó la monocapa dos veces con PBS estéril, luego se colocó 10 ml de solución de tripsina (Tripsina 0,75 gr/l; EDTA 0,2 gr/l) y se llevó a la estufa a 37 °C durante 5-8 minutos. Cuando se observaron los primeros indicios de desprendimiento celular, se levantó la monocapa con ayuda de un *scraper* y se diluyó en 10 ml de DMEM para inactivar la enzima. Se centrifugó a baja velocidad durante 5 minutos, se descartó el medio y se reemplazó por medio DMEM fresco. Se tomaron 50 µl de la suspensión de células y se mezclaron con igual volumen de una solución de azul tripán (al 10 % v/v en PBS). Se realizó el recuento de células en una cámara de Neubauer contando solo aquellas células que se veían brillantes (es decir, que estaban viables). Se realizó la dilución apropiada para cada línea celular y se procedió a preparar las placas para los ensayos, ajustando la concentración a 2,5 x 10⁵ células / fosa.

Para los ensayos, las células fueron sembradas en placas de 24 fosas (Corning Costar Co., Cambridge, MA, USA). A cada fosa se le agregó 0,5 ml de la suspensión de células correspondiente para cada línea. Las placas con células Caco-2/TC-7 se incubaron 7 días (células en confluencia) a 37 °C en una estufa de atmósfera controlada (5 % CO₂ – 95 % aire) cambiando el medio cada 2 días.

1.2.6.2 Ensayo de adhesión a células intestinales Caco-2/TC-7

Se realizó el estudio de la adhesión de lactobacilos a células intestinales *in vitro*, según el protocolo descrito por Golowczyc et al. (2007).

La línea celular Caco-2/TC-7 es un clon de la línea de epitelio intestinal Caco-2, de origen humano y proveniente de adenocarcinoma de colon (ATCC HTB-37) (Fogh et al., 1977). Esta línea celular desarrolla de forma espontánea, una diferenciación morfológica y funcional de tipo enterocitario en las condiciones estándar de cultivo (Pinto et al., 1983; Rousset, 1986; Meunier et al., 1995; Grés et al., 1998). Las células diferenciadas forman una monocapa de células polarizadas, presentando microvellosidades en su parte apical

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

y separándose del dominio basolateral por fuertes uniones estrechas, estado de diferenciación mantenido en el tiempo. Adicionalmente, este clon posee como importante ventaja un tiempo de duplicación de 24 horas (en comparación con las 34 horas para la línea progenitora), lo que permite llegar a diferenciarse al cabo de 7 días. Se partió de un cultivo en fase estacionaria, el cual se centrifugó a 6.000 rpm por 8 minutos y se descartó el sobrenadante. Se realizó un doble lavado del pellet con PBS estéril y se suspendió en DMEM de adhesión (Medio mínimo esencial de Eagle, modificado por Dulbecco; **Apéndice 2**), ajustando la concentración de trabajo a $1 - 2 \times 10^8$ UFC/ml.

Se realizó un doble lavado de la placa de células con PBS estéril, se adicionó la suspensión bacteriana y se incubó la placa por 1 hora a 37 °C en estufa de atmósfera controlada (5 % CO₂ y 95 % aire). Pasado el tiempo de incubación, se descartó la suspensión líquida de las fosas y se realizó un doble lavado con PBS para remover bacterias no adheridas. Por último, se agregó 1 ml de agua destilada estéril y se incubó por 1 hora a 37 °C para favorecer la lisis celular. Se tomó el total del volumen de cada fosa y se realizaron diluciones seriadas. Se realizó el recuento en agar MRS del inóculo inicial y después del proceso de adhesión, considerando al recuento final como correspondiente a las bacterias adheridas a las células.

Los resultados se expresaron como porcentaje de adhesión bacteriana (% A):

$\% A = [\text{concentración de bacteriana adheridas (UFC/ml)} / \text{Concentración bacteriana agregada a la fosa (UFC/ml)}] \times 100$

Los resultados expresados son la media de tres ensayos realizados en tres experimentos independientes.

1.2.7 Crecimiento en diferentes medios de cultivo

Se evaluaron cuatro medios de cultivo formulados y se compararon con los resultados obtenidos en medio MRS (tradicional para lactobacilos): medio A (ver **Apéndice 1**), medio C (ver **Apéndice 2**) permeado de suero (PS) (5 % p/v) (Arla Foods Ingredients S.A.) y PS (5 % p/v) suplementado con extracto de levadura (1 % p/v) (Biokar®), fuente importante de nitrógeno. De acuerdo a León Peláez (2013), el PS está compuesto principalmente por $3,33 \pm 0,35$ % de lactosa, $5,30 \pm 0,2097$ % p/p grados Brix y $0,0207 \pm 0,0002$ % de nitrógeno.

El permeado de suero deshidratado en polvo se reconstituyó en agua destilada al 5 % p/v y fue esterilizado en autoclave durante 121 °C por 15 minutos.

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

Se partió de un cultivo microbiano en fase estacionaria en medio MRS (inóculo inicial de trabajo), el cual fue inoculado al 1 % v/v en 100 ml del medio de cultivo correspondiente y se incubó a 37 °C. Se tomaron alícuotas del cultivo a diferentes períodos de tiempo para determinar la concentración microbiana. Para ello se hicieron diluciones seriadas y recuentos en placas con agar MRS. Adicionalmente se hicieron medidas de acidez utilizando un pHmetro (Altronix®), hasta llegar a valor constante de pH. Las curvas de crecimiento son el resultado del ensayo realizado por triplicado.

1.2.8 Caracterización fenotípica de acuerdo al perfil de fermentación de azúcares

A fin de ampliar la identificación a nivel molecular, se evaluó el perfil de fermentación de azúcares utilizando el kit API 50 CH (bioMérieux®, Francia) para la identificación de género y especie de lactobacilos. El mismo es un sistema estandarizado compuesto por una cámara de incubación (fondo y tapa) y una galería de 49 azúcares fermentables más una fosa como control de crecimiento.

Se partió de un cultivo fresco de cada lactobacilo, del cual se tomó una alícuota y se centrifugó 5 minutos a 10.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con PBS estéril. La concentración de trabajo del inóculo se ajustó a un valor aproximado de 1×10^6 UFC/ml en el medio de siembra API 50 CHL. Se inocularon 130 μ l de la suspensión bacteriana en cada una de las 50 fosas, apoyando la punta de la pipeta en el borde de las mismas para evitar la formación de burbujas. Previamente, se depositó una gota de agua destilada estéril en cada uno de los alveolos del fondo para crear una atmósfera húmeda. Las galerías fueron incubadas a 37 °C y se realizaron lecturas a las 24 y 48 horas de fermentación.

El resultado se evidenció por viraje del indicador presente en el medio de siembra (púrpura de bromocresol): **positivo** (amarillo) o **negativo** (azul/violeta). Los resultados dudosos (verdes) fueron considerados como negativos.

La identificación de los cultivos se realizó de acuerdo a la tabla de identificación provista por el fabricante (bioMérieux®, 2007) y bibliografía adicional consultada (Embley et al., 1989; Manual Sistemático Bacteriológico Bergey, 1994).

1.2.9 Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos son el promedio de experimentos realizados por duplicado o triplicado. Se presentan como los valores medios y sus correspondientes desviaciones estándar (DE). Todos los parámetros se analizaron con el programa estadístico GraphPadPrism versión 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California). Se consideraron diferencias significativas los valores de $p < 0,05$. Para el ensayo de adhesión a células intestinales Caco-2/TC-7, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y test de Tukey de múltiples comparaciones.

Nota: algunos resultados informados fueron realizados por otros integrantes del proyecto PID 2014-0049, en paralelo a esta Tesis. En esos casos, sólo se hará mención a los resultados obtenidos, haciendo referencia al autor.

1.3 Resultados y Discusión

1.3.1 Obtención de microorganismos aislados

A partir del aislamiento, se obtuvieron 59 aislados (ver **Tabla 2**), de los cuales el 24 % fue extraído de buche, el 29 % de la sección intestinal yeyuno-íleon y el 47 % de ciegos. Se observaron diferentes morfologías de colonias presentando distintos tamaños, color y forma. Más de la mitad de las colonias (53 %) fueron medianas y chicas, de coloración blanca, lechosa o mucosa. También se obtuvieron colonias transparentes y con bordes estrellados. En las placas que presentaron diferente morfología de colonia, se tomó una de cada tipo para la realización de las pruebas bioquímicas básicas que permitieron realizar una caracterización preliminar de las mismas. Todas las colonias fueron catalasa (-) y Gram (+). Se observaron al microscopio tres morfologías diferentes: bacilos, cocos y coco - bacilos. Estos datos se encuentran detallados en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Características fenotípicas de las colonias aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos de 10 y 22 días de vida a partir de agar MRS, agar M17, agar SF y medio MRS suplementado con 6,5 % p/v de NaCl, en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Todas las colonias obtenidas fueron Gram (+) y catalasa (-).

NOMBRE	Órgano de origen	Edad del animal (días)	Condición de Aislamiento	Morfología de colonia	Morfología microscópica
B1	Buche	22	Aerobiosis	Colonia color blanca, brillante, con elevación y pequeño halo translúcido, redonda	Bacilos medianos y cortos, engrosados
B2	Buche	22	Aerobiosis	Colonia tamaño pequeño, blanca, cerosa y redonda	Bacilos cortos
B3	Buche	22	Aerobiosis	Colonia tamaño mediano, blanca, cremosa, redonda	Bacilos medianos y cortos, engrosados
B4	Buche	22	Aerobiosis	Colonia tamaño mediano, blanca, cremosa, redonda	Bacilos medianos y cortos, engrosados
B5	Buche	10	Aerobiosis	Colonia color blanca, brillante, con elevación y pequeño halo translúcido, redonda	Bacilos pequeños
B6	Buche	10	Aerobiosis	Colonia traslúcida, rugosa redondeada	Bacilos medianos
B7	Buche	10	Aerobiosis	Colonia traslúcida, con centro negro (alta densidad de material), redonda	Bacilos pequeños
B8	Buche	10	Anaerobiosis	Colonia color blanca, brillante, con elevación y	Bacilos pequeños

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

				pequeño halo translúcido, redonda	
B9	Buche	10	Anaerobiosis	Colonia traslúcida, rugosa, redondeada	Bacilos pequeños
B10	Buche	10	Anaerobiosis	Colonia color blanca, brillante, con elevación y pequeño halo translúcido, redonda	*
B11	Buche	10	Anaerobiosis	Colonia traslúcida, rugosa, redondeada	
B12	Buche	10	Anaerobiosis	Colonia de tamaño pequeño, opaca, translúcida, sin elevación, redonda	Bacilos engrosados
B13	Buche	10	Anaerobiosis	Colonia de tamaño pequeño, translúcida, brillante, redonda	Bacilos pequeños
B14	Buche	10	Anaerobiosis	Colonia de tamaño grande, blanca, textura cremosa, brillante	Bacilos pequeños.
Y1	Yeyuno-íleon	22	Aerobiosis	Colonia color blanca, brillante, con elevación y pequeño halo translúcido, redonda	Bacilos cortos
Y2	Yeyuno-íleon	22	Aerobiosis	Colonia color blanca, brillante, con elevación y pequeño halo translúcido, redonda	Bacilos medianos y cortos.
Y3	Yeyuno-íleon	22	Aerobiosis	Colonia tamaño pequeño, translúcida, redonda	Bacilos cortos y largos
Y4	Yeyuno-íleon	22	Aerobiosis	Colonia tamaño pequeño-mediano, blanca, translúcida, redonda	Bacilos cortos y medianos
Y5	Yeyuno-íleon	22	Aerobiosis	Colonia de tamaño pequeño, blanca, sin halo translúcido, redonda	Cocos
Y6	Yeyuno-íleon	22	Aerobiosis	Colonia de tamaño pequeño, translúcida, redonda	Bacilos medianos
Y7	Yeyuno-íleon	22	Aerobiosis	Colonia de tamaño mediano, translúcida, con bordes irregulares, redonda	Bacilos cortos y medianos
Y8	Yeyuno-íleon	22	Aerobiosis	Colonia translúcida, redonda	Bacilos cortos y medianos
Y9	Yeyuno-íleon	10	Aerobiosis	Colonia traslúcida, con un centro puntiforme y halo, redondeada	Bacilos pequeños
Y10	Yeyuno-íleon	10	Aerobiosis	Colonia de tamaño pequeño, blanca-translúcida, opaca, redondeada	Bacilos pequeños y medianos
Y11	Yeyuno-íleon	10	Aerobiosis	Colonia color blanca, brillante, con elevación y pequeño halo translúcido, redonda	Cocobacilos y bacilos pequeños
Y12	Yeyuno-íleon	10	Aerobiosis	Colonia traslúcida, rugosa, redondeada	Bacilos engrosados, pequeños

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

Y13	Yeyuno -íleon	10	Anaerobiosis	Colonia traslúcida, rugosa, redondeada	*
Y14	Yeyuno -íleon	10	Anaerobiosis	Colonia de tamaño pequeño, opaca, translúcida, sin elevación, redonda	Bacilos cortos, engrosados
Y15	Yeyuno -íleon	10	Anaerobiosis	Colonia blanca, brillante, redondeada.	Cocobacilos
Y16	Yeyuno -íleon	10	Anaerobiosis	Colonia de tamaño mediano, blanca, translúcida, poco elevada	Bacilos medianos
Y17	Yeyuno -íleon	10	Anaerobiosis	Colonia de tamaño pequeño, blanca, brillante	Bacilos medianos
C1	Ciego	22	Aerobiosis	Colonia color blanca, brillante, con elevación y pequeño halo translúcido, redonda	Bacilos cortos y medianos, engrosados
C2	Ciego	22	Aerobiosis	Colonia color blanca, brillante, con elevación y pequeño halo translúcido, redonda	Bacilos medianos y cortos, engrosados
C3	Ciego	22	Aerobiosis	Colonia de tamaño mediano, traslúcida, redonda	Bacilos largos
C4	Ciego	22	Aerobiosis	Colonia de tamaño mediano, traslúcida, redonda	Bacilos cortos, medianos y largos, engrosados
C5	Ciego	22	Aerobiosis	Colonia color blanca- crema, con poca elevación, redonda	Bacilos medianos y cortos, engrosados
C6	Ciego	22	Aerobiosis	Colonia de tamaño mediano, color blanco, traslúcida	Bacilos medianos y cortos
C7	Ciego	22	Aerobiosis	Colonia blanco- traslúcida, redondeada	Bacilos cortos, engrosados
C8	Ciego	22	Aerobiosis	Colonia redonda, mediana, traslúcida	Bacilos cortos, engrosados
C9	Ciego	22	Aerobiosis	Colonia de tamaño mediano, blanca, redonda	Bacilos medianos, dispersos
C10	Ciego	10	Aerobiosis	Colonia color blanca, brillante, con elevación y pequeño halo translúcido, redonda	Bacilos pequeños
C11	Ciego	10	Aerobiosis	Colonia traslúcida, rugosa, redondeada	Bacilos pequeños.
C12	Ciego	10	Aerobiosis	Colonia tamaño pequeño, translúcida, redonda	Bacilos medianos
C13	Ciego	10	Aerobiosis	Colonia tamaño mediano, marrón claro, translúcida, redondeada	Bacilos pequeños, tinción muy clara
C14	Ciego	10	Aerobiosis	Colonia color blanca, brillante, con elevación y pequeño halo translúcido, redonda	Bacilos engrosados, pequeños
C15	Ciego	10	Aerobiosis	Colonia traslúcida, rugosa, redondeada	Bacilos engrosados, de tamaño corto a mediano
C16	Ciego	10	Aerobiosis	Colonia blanquecina, redonda	Bacilos engrosados y medianos

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

C17	Ciego	10	Aerobiosis	Colonia de tamaño pequeño, opaca, translúcida, sin elevación, redonda	Bacilos pequeños
C18	Ciego	10	Anaerobiosis	Colonia blanca, brillante, redondeada.	Cocobacilos
C19	Ciego	10	Anaerobiosis	Colonia de tamaño grande, marrón, con centro más oscuro y alrededores irregulares	Bacilos
C20	Ciego	10	Anaerobiosis	Colonia de tamaño pequeño, translúcida	Cocobacilos engrosados
C21	Ciego	10	Anaerobiosis	Colonia de tamaño muy pequeño, blanca, translúcida, redonda	Cocobacilos muy pequeños
C22	Ciego	10	Anaerobiosis	Colonia de tamaño pequeño, blanca, brillante, redonda	Cocobacilos muy pequeño
C23	Ciego	10	Anaerobiosis	Colonia color blanca, brillante, con elevación y pequeño halo translúcido, redonda	Bacilos pequeños
C24	Ciego	10	Anaerobiosis	Colonia tamaño pequeño, blanca, con bordes definidos	Cocobacilos engrosados
C25	Ciego	10	Anaerobiosis	Colonia muy pequeña, blanca	Cocobacilos pequeños
C26	Ciego	10	Anaerobiosis	Colonia pequeña, con un punto negro central	Cocobacilos pequeños
C27	Ciego	10	Anaerobiosis	Colonia de tamaño grande, marrón, cremosa, bordes difusos, redondeada	Bacilos pequeños
C28	Ciego	10	Anaerobiosis	Colonia marrón, translúcida, bordes definidos, redonda	Cocobacilos pequeños, engrosados
COCO 1	Ciego	10	Aerobiosis	Colonia redondeada, translúcida	Cocos
COCO 2	Ciego	10	Aerobiosis	Colonia color amarillo-blanquecina, elevada	Cocos
COCO 3	Yeyuno -íleon	10	Aerobiosis	Colonia color amarillo-blanquecina, elevada	Cocos

*Aislados que se perdieron durante los sucesivos pasajes en condiciones de aerobiosis.

1.3.2 Resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal aviar *in vitro*

Debido a las numerosas bacterias lácticas aisladas, se eligió como estrategia de trabajo la sugerida por de Melo Pereira et al. (2018): realizando un abordaje "paso a paso". Este consistió en una secuencia de pruebas para seleccionar progresivamente el número de aislados con potencialidad probiótica.

Como se detalló en la introducción general, para que un microorganismo sea considerado probiótico debe cumplir una serie de requisitos fundamentales como poseer

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

resistencia a la acidez gástrica, resistencia a la bilis y capacidad de adhesión al epitelio intestinal, entre otros (Blajman, 2017). También es importante evaluar las propiedades tecnológicas, como la capacidad de crecer en diferentes medios de cultivo y resistir las condiciones de preservación, y para lograr una futura aplicación a gran escala.

La simulación de las condiciones *in vitro* que se presentan en el TGI de los pollos es una aproximación a la capacidad de los microorganismos de sobrevivir a las condiciones reales del tracto y alcanzar los sitios de colonización en forma viable y a la máxima concentración posible (Frizzo et al., 2006).

Para los siguientes estudios, se utilizó la cepa *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 como cepa de referencia, la cual fue aislada de gránulo de kefir (Garrote, 1999) y ampliamente estudiada en nuestro grupo de investigación. Este microorganismo ha demostrado tener una alta resistencia a las condiciones del TGI humano y adecuadas características tecnológicas (Golowczyc et al., 2011; Hugo et al., 2016; Moretti et al., 2018), además de poseer propiedades antimicrobianas (Golowczyc et al., 2008), capacidad de reducir la toxicidad de la toxina Shiga de *Escherichia coli* O157:H7 en células Vero y de secuestrar *in vitro* aflatoxina AFB1 (Kakisu et al., 2013; Moretti et al., 2018).

A continuación, se presentan los resultados de los siguientes ensayos *in vitro*: tolerancia a bilis, tolerancia a la acidez y resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal (TGI).

-Tolerancia a bilis

La bilis es una secreción acuosa vital del hígado, la cual es sintetizada por los hepatocitos y modificada posteriormente por el epitelio del conducto biliar.

La misma está constituida por 95 % de agua, en donde se encuentran disueltos una serie de constituyentes tanto endógenos, como sales biliares, bilirrubina, colesterol, aminoácidos, esteroides, enzimas, porfirinas, vitaminas y metales pesados, como exógenos (drogas, xenobióticos y toxinas ambientales). Debido al carácter anfipático de las sales biliares, estas moléculas pueden actuar como detergentes en el ambiente intestinal, produciendo daño a nivel estructural en la membrana celular y en el ADN bacteriano (Merritt & Doaldson, 2009). Por lo que es de importancia evaluar la tolerancia a bilis como un requisito primario de cualquier aislado a considerarse como probiótico. De acuerdo a lo descrito en el **Sección 1.2.4** (Materiales y Métodos), la tolerancia al crecimiento en presencia de bilis se evaluó de manera cuantitativa asignando puntajes

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

según el método ecométrico, donde los valores máximo y mínimo obtenidos son 15 y 0, respectivamente (**Tabla 3**).

Previamente, se realizó una comparación respecto al uso de bilis fresca de pollo y bilis de buey deshidratada comercial. Estos estudios comparativos con pocos aislados no mostraron diferencias significativas en los resultados obtenidos. Por lo tanto, se continuó trabajando con bilis de buey deshidratada.

Se empleó como referencia la cepa *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114.

Tabla 3. Tolerancia al crecimiento en presencia de bilis de los aislados bacterianos determinada por el método ecométrico.

BUCHE		YEYUNO-ÍLEON		CIEGO	
Aislado	Puntaje	Aislado	Puntaje	Aislado	Puntaje
B1	13,5	Y1	15	C1	9
B2	9,5	Y2	7,5	C2	12
B3	0	Y3	9,5	C3	15
B4	7,5	Y4	7,5	C4	1,5
B5	7,5	Y5	8	C5	15
B6	7,5	Y6	8	C6	7,5
B7	7,5	Y7	9	C7	8
B8	15	Y8	5	C8	8
B9	15	Y9	5	C9	15
B10	0	Y10	0	C10	7,5
B11	0	Y11	15	C11	0
B12	15	Y12	15	C12	5
		Y13	0	C13	5
		Y14	0	C14	15
		Y15	10,5	C15	1,5
				C16	15
				C17	15
				C18	12,5
				C19	15

* *L. plantarum* CIDCA 83114 obtuvo un valor de 15 puntos, el cual es el máximo puntaje posible.

De acuerdo con lo expuesto en la **Tabla 3**, los aislados presentaron diferente crecimiento en agar en presencia de bilis (0,5 % p/v). Respecto al total de los aislados, el 37 % obtuvo un puntaje en el rango de 15 a 10 (alta resistencia), el 43 % en el rango de 10 a 5 (media resistencia), mientras que el 20 % estuvo dentro del de 5 a 0 (baja resistencia). Si se analiza el resultado de acuerdo a los órganos de origen, se observó

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

que la resistencia alta, media y baja en el buche fue de 33 %, 42 % y 25 % respectivamente; en yeyuno íleon fue 27 %, 53 % y 20 %, respectivamente y en los ciegos fue 47 %, 37 % y 16 % respectivamente en ciegos.

Jin et al. (1998) demostraron que doce cepas del género *Lactobacillus* de origen aviar fueron afectadas levemente por las sales biliares (0,3 % v/v). Los resultados de la resistencia frente a las sales biliares están respaldados por los hallazgos de Gilliland (1979), quien informó que los lactobacilos aislados del intestino animal mostraron una alta tolerancia a las sales biliares. En estudios más recientes, Ashraf et al. (2009) determinaron que las cepas de *Lactobacillus* de origen aviar analizadas demostraron resistencia frente a diferentes concentraciones (0,3 – 1 % v/v) de bilis. Adicionalmente, los resultados de esta Tesis concuerdan con los hallados por Mantilla et al. (2012), donde se observó que tres lactobacilos nativos son capaces de sobrevivir a concentraciones de sales biliares desde 0,05 % p/v hasta 0,3 % p/v, pudiendo desarrollar sus actividades metabólicas sin verse completamente inhibidas, comportamiento típico observado en microorganismos aislados de aves de corral.

Recientemente, Hidayat et al. (2018) obtuvieron resultados similares en cuanto a la variabilidad de la resistencia a sales biliares de lactobacilos aislados del TGI de pollos, donde todos los microorganismos fueron capaces de resistir, con descensos en las concentraciones en el rango de 1 a 4 órdenes logarítmicos.

La composición y concentración de bilis en el tracto intestinal aviar es un parámetro variable, dependiente de diferentes factores como la edad del animal y el tipo de alimentación (Ravindran et al., 2016). En el caso de las bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*, éstas son capaces de producir la enzima sal biliar hidrolasa (SBH), que cataliza la hidrólisis de las sales biliares conjugadas con glicina y taurina. Esta desconjugación puede ocurrir en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, ya que la actividad de la SBH se incrementa al disminuir el pH por producción de gran cantidad de ácidos orgánicos (Corzo & Gilliland, 1999). Por lo que sería interesante a futuro realizar el estudio de la actividad lipolítica de estas bacterias aisladas.

Uno de los factores importantes que está directamente relacionado con la tolerancia a la bilis es la estructura y composición de la pared celular bacteriana, la cual puede presentar diferencias dentro de un mismo género microbiano (Prasad et al., 1998; Ávila et al., 2010). Esto podría explicar porque, aunque todas los aislados evaluados de *Lactobacillus* son capaces de tolerar la presencia de bilis en el medio de cultivo, algunos resisten mejor que otros.

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

Se concluyó que el 80% de los aislados evaluados demostró una resistencia de tipo alta-media. Adicionalmente, la tendencia indicó que no hubo una correlación entre el órgano de origen de los aislados y el crecimiento en presencia de bilis.

-Tolerancia al pH estomacal

Se debe aclarar que las aves no tienen un único órgano análogo al estómago de los humanos, sino que poseen dos: el proventrículo (estómago glandular) y la molleja (estómago muscular). Una vez que el alimento arriba al proventrículo, se segregan los jugos gástricos (compuestos principalmente por pepsina y HCl), los cuales pasarán rápidamente a la molleja junto con el alimento. Allí, se llevará a cabo la digestión mecánica por trituración, además de la digestión enzimática asociada a la presencia de los jugos gástricos.

Las condiciones de pH varían mucho a lo largo del TGI en los pollos. Las bacterias con potencialidad probiótica deben tener resistencia a diversos valores del pH, donde el valor más bajo se encuentra en la parte ventricular (pH 2 - 3,5). La acidez de la secreción gástrica producida en la molleja es la primera barrera de defensa y una de las principales, junto a la bilis, que el animal posee frente al ingreso de microorganismos durante la ingesta de alimentos. La capacidad de sobrevivir al proceso enzimático de la digestión, a la acidez de la molleja y a las secreciones biliares intestinales, y de esta manera poder llegar viables a la mucosa intestinal, es una de las características de especial importancia para un microorganismo con potencialidad probiótica (West, 1996; Naidu et al., 1999).

Al exponer las cepas aisladas a una solución gástrica constituida de HCl / NaCl - pepsina, a pH 3 y temperatura de 41 ° C, se pretende "simular" el paso de estos microorganismos por la molleja luego de la ingesta y su exposición con los jugos gástricos secretados en el proceso de la digestión. De esta manera, podemos estimar qué proporción de ellos arribarán viables al intestino.

Para este estudio, se empleó el método cualitativo de Desarrollo en Medio Líquido (DML), cuyo fundamento consiste en determinar si el pH del medio es un factor inhibitorio del desarrollo de los lactobacilos en medio líquido. El valor de pH utilizado (pH 3) corresponde a la acidez presente en el ambiente gástrico aviar (Duke, 1986).

Se evaluaron aislados con un amplio rango de resistencia a la bilis (de acuerdo a la evaluación realizada en la sección anterior), a fin de determinar si existía también variabilidad en la resistencia a la acidez en la totalidad de los aislados.

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

Se evaluó la viabilidad de los aislados bacterianos, expresada en porcentaje de resistencia %R pH, durante la incubación en medio ácido (pH 3) utilizando como cepa de referencia a *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 (**Tabla 4**).

Tabla 4. Resistencia (expresada en porcentaje) de los aislados bacterianos al pH estomacal (pH 3) luego de 2 horas de incubación a 41°C. *L. plantarum* CIDCA 83114 obtuvo un porcentaje de resistencia de 68,4 %.

BUCHE		YEYUNO-ÍLEON		CIEGO	
Aislado	Resistencia al pH (%)	Aislado	Resistencia al pH (%)	Aislado	Resistencia al pH (%)
B1	43,2	Y1	73,8	C1	100,0
B2	46,6	Y2	34,9	C2	100,0
B3	73,0	Y3	100,0	C3	9,9
B4	77,4	Y4	26,6	C4	64,8
		Y5	100,0	C5	90,7
		Y6	42,6	C6	33,8
		Y7	89,5	C7	100,0
				C8	100,0
				C9	17,2

El efecto de la acidez sobre la viabilidad de los aislados fue variable ya que se encontraron porcentajes de resistencia entre 10 y 100 % dentro de la colección evaluada (**Tabla 4**). Los aislados que presentaron porcentajes de resistencia por encima del 50% fueron: Y3 (100,0), Y5 (100,0), C1 (100,0), C2 (100,0), C7 (100,0), C8 (100,0), C5 (90,7), Y7 (89,5), B4 (77,4), Y1 (73,8), B3 (73,0) y C4 (64,8).

Adicionalmente, se observó que no hubo correlación entre el órgano de origen y la resistencia a la acidez, donde el porcentaje de aislados con resistencia mayor a 50 % en buche, yeyuno-íleon y ciegos fue de 50 %, 57 % y 67 %, respectivamente.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otras investigaciones. Hidayat et al. (2018) halló que cuatro aislados de bacterias lácticas, obtenidos de intestino delgado de pollos, fueron capaces de crecer en medio sólido acidificado a diferentes valores de pH (3, 4, 5 y 6), con un descenso en la concentración entre 1 y 3, 5 órdenes logarítmicos respecto al inóculo inicial.

Rajoka et al. (2018) evaluó la supervivencia a pH 2 y pH 3 de trece aislados de bacterias lácticas de ciegos de las especies *Lactobacillus reuteri*, *L. vaginalis*, *L. ingluviei* y *L. johnsonii*, y luego de 3 horas de incubación en esas condiciones, el porcentaje de

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

supervivencia resultó alto para todos los aislados evaluados, tanto a pH 2 (82 %) como a pH 3 (93 %).

El trabajo realizado por Aziz et al. (2019) demostró que de un total de 20 aislados a partir de contenido cecal (identificados en su mayoría como *Lactobacillus reuteri* y, en menor proporción, *L. ingluviei* y *L. johnsonii*), las cepas de *L. reuteri* fueron capaces de tolerar un pH de 4 pero ninguna sobrevivió a pH 1,5. Sin embargo, Zielińska et al. (2015) determinó que 17 cepas pertenecientes a las especies *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. johnsonii* (aisladas a partir de vegetales fermentados) presentaron diferentes grados de sensibilidad frente a la acidez gástrica: *L. johnsonii* fue el aislado que obtuvo el mayor porcentaje de supervivencia (más del 98 %) luego de 30 minutos de incubación en una solución a pH 1,5; luego de 60 minutos de incubación, los aislados *L. casei* y *L. plantarum* obtuvieron los porcentajes de supervivencia más altos (rango 57 – 68 %) y, pasados los 90 minutos, sólo cuatro aislados de esas dos especies lograron sobrevivir con porcentajes en el rango 23 – 38 %.

En un trabajo en donde se estudiaron aislados de *Lactobacillus* sp. provenientes de materia fecal y órganos de pollos, Noohi et al. (2014) reportaron que el 33 % de los mismos fueron resistentes a pH 3, siendo *L. vaginalis* y *L. plantarum* las especies más resistentes. De acuerdo al estudio de Taheri et al. (2009), la cepa *L. johnsonii* LT171, aislada de íleon de pollo, demostró poseer resistencia a pH 3.

Por su parte, Kizerwetter-Świda & Binek (2016) estudiaron cuatro lactobacilos (identificados como *L. salivarius* y *L. brevis*) aislados de materia fecal fresca y determinaron que tenían una alta resistencia a pH de 2,5 y a las sales biliares.

Según Siegumfeldt et al. (2000), la capacidad de las bacterias lácticas para sobrevivir a pH bajos se basa en poder ajustar su pH intracelular a la disminución del pH extracelular, y así evitar un gradiente de protones. De acuerdo con Cotter & Hill (2003), existen varios mecanismos por los cuales las bacterias regulan el pH interno, pero el más importante es la translocación de protones por la enzima ATP-asa. Si esto no fuera posible, la acidificación interna reduciría la actividad de las enzimas, dañando proteínas y el ADN, lo que conduciría a la muerte celular (Van De Guchte et al., 2002). La tolerancia a condiciones ácidas de crecimiento también está relacionada estrechamente con la composición de la membrana citoplasmática, lo cual depende del tipo de bacteria, el medio de crecimiento y las condiciones de incubación (Hood & Zotolla, 1988; Madureira et al., 2005).

De la colección completa de bacterias aisladas y evaluadas en este trabajo, se pudo determinar una gran variabilidad en cuanto a la tolerancia a condiciones de acidez y a la presencia de bilis. De acuerdo a la comparación de los dos *screening* realizados

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

anteriormente, se comprobó que las resistencias variaban de una condición a otra. Si evaluamos el comportamiento de la cepa de referencia *L. plantarum* CIDCA 83114, podemos observar que los resultados obtenidos fueron el máximo valor de tolerancia a bilis (puntaje 15) pero no así en la evaluación de la tolerancia al pH estomacal (68,4%), donde otros aislados tuvieron valores de tolerancia superiores. El comportamiento opuesto se observó en el aislado B3, el cual obtuvo el mínimo puntaje (0) para la tolerancia a bilis, pero resultó ser resistente al pH estomacal (73 %). Sin embargo, también se encontró que ciertos aislados demostraron capacidad de sobrevivir a las dos condiciones evaluadas, como el caso de C2 y C5 que obtuvieron un 100 % y 90 % de resistencia a la condición ácida y 12 y 15 puntos en el ensayo de tolerancia a bilis, respectivamente.

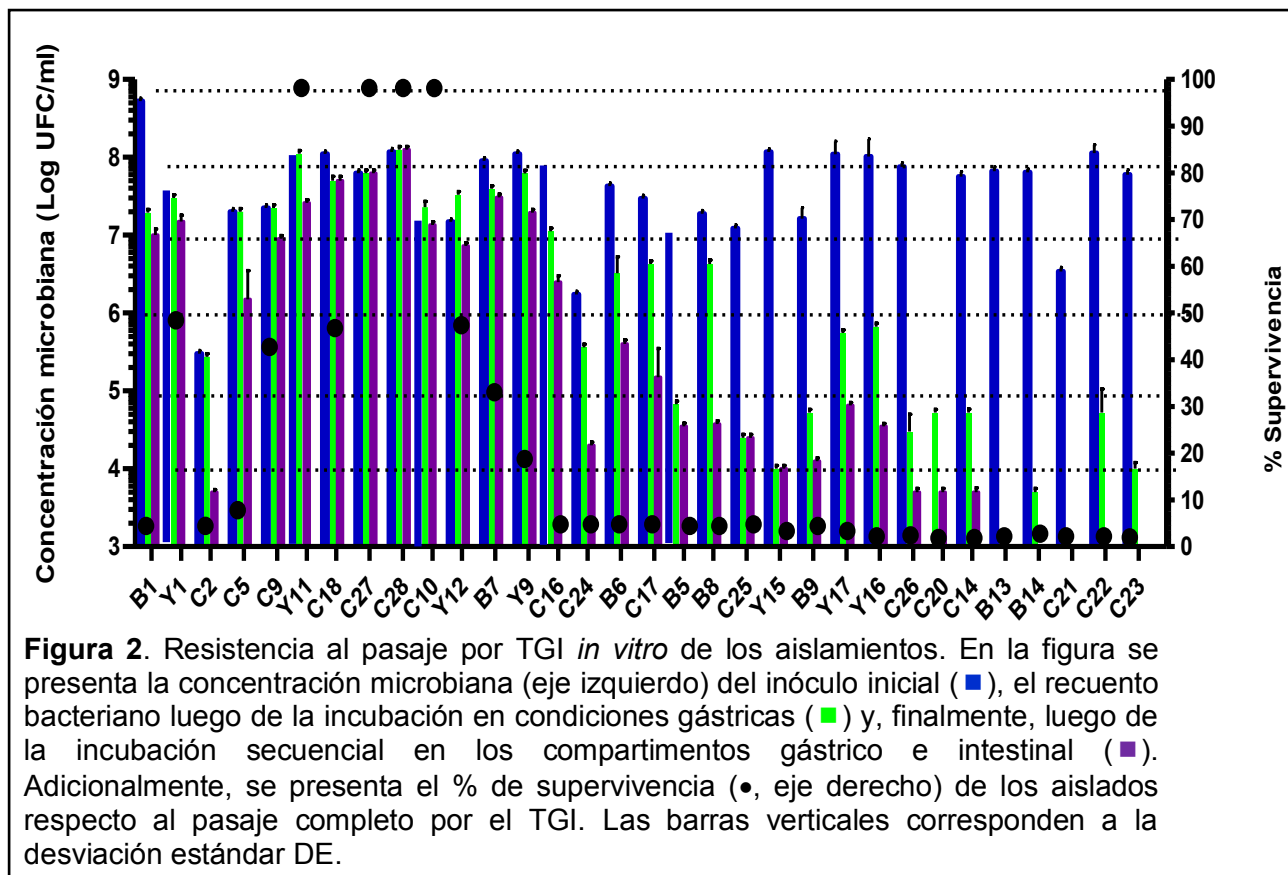
Cabe señalar que los estudios de tolerancia a la bilis y al pH estomacal fueron realizados a título de pruebas preliminares. Con el fin de completar el proceso de pre-selección, se determinó la resistencia al pasaje por el TGI *in vitro* cuyos resultados se presentan a continuación.

-Resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal (TGI) *in vitro*

La alta concentración de ácidos y bilis en la molleja e intestino de las aves son factores selectivos para considerar una cepa como probiótica (Hyronimus et al., 2000). Sin embargo, los estudios de pasaje por el TGI se acercan más a las condiciones reales ya que contemplan la presencia de enzimas gástricas e intestinales (pepsina y pancreatina), que podrían afectar la viabilidad de los microorganismos.

Se evaluó la resistencia al pasaje gastrointestinal de 32 de las bacterias aisladas mediante una aproximación *in vitro*, realizando incubaciones secuenciales en soluciones que simulan los compartimientos gástrico e intestinal, tal como se describió en la **Sección 1.2.4 (Materiales y Métodos)**, basado en el protocolo modificado según Musikasang et al. (2009). En este estudio se ajustó la temperatura, los tiempos de retención del bolo alimenticio y los valores de pH de los diferentes segmentos del tracto digestivo aviar.

La concentración de bacterias que sobrevivieron a los diferentes tramos del TGI se determinó por recuento de viables en placa y los resultados obtenidos se observan en la siguiente figura (**Figura 2**):



Los aislados presentaron susceptibilidades variables a las condiciones enzimáticas y de acidez presentes en el tracto gastrointestinal aviar *in vitro*. Del total de los aislados, el 34 % disminuyó su viabilidad en un orden logarítmico (máximo) luego de la incubación secuencial en las soluciones de jugo gástrico y jugo intestinal simulados, con porcentajes de supervivencia en el rango de 100 a 7,5 % (Y11, C18, C27, C28, C10, Y12, Y1, C9, B7, Y9, C5) (**Figura 2**). Un reducido número de los aislados (13 %) presentó porcentajes de supervivencia entre 2 % y 1 %, y la concentración microbiana disminuyó entre 1 y 2 órdenes logarítmicos respecto al recuento inicial (B1, C2, C16 y C24). En cuanto al 53 % restante de los aislados, el porcentaje de supervivencia fue menor al 1% y la diferencia entre el recuento inicial y final fue, como mínimo, de 2 órdenes logarítmicos (B6, C17, B5, B8, C25, Y15, B9, Y17, Y16, C26, C20, C14, B13, B14, C21, C22 y C23).

En investigaciones realizadas por Luján Cejas en el marco del proyecto PID 2014-0049, se estudiaron los tres aislados con forma de coco presentados en la **Tabla 2**. Los resultados mostraron que el porcentaje de resistencia al TGI de los aislados Coco 1, Coco 2 y Coco 3 estuvo dentro del rango 1 - 19 %. En el caso de Coco 1, la concentración al final del pasaje por el TGI disminuyó en aproximadamente un orden logarítmico y el porcentaje de supervivencia fue el más alto de los tres (19 %); en

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

cambio, la concentración de Coco 2 y Coco 3 disminuyó en 1 y 2 órdenes logarítmicos con porcentajes de supervivencia de 5 % y 1 %, respectivamente.

Musikasang et al. (2009) halló que, de un total de 322 bacterias lácticas aisladas a partir de distintos órganos del tracto gastrointestinal de pollos, sólo 6 fueron capaces de sobrevivir al pasaje completo *in vitro*, con porcentajes de supervivencia en el rango 43,7 - 27,2 %; para el resto de los aislados, el recuento microbiano presentó una disminución entre 1 y 2 órdenes logarítmicos. Estos 6 aislados se identificaron como *Enterococcus faecalis*, *E. durans*, *E. faecium* y *Pediococcus pentosaceus*. Estos valores difieren a los hallados en esta Tesis respecto a la resistencia de los cocos.

De acuerdo a la bibliografía, la resistencia también depende del origen de los aislados, no sólo de la especie bacteriana. Por ejemplo, Lin et al. (2007) informaron que la cepa *L. acidophilus* (de origen aviar) fue uno de los aislados con menor supervivencia en el extracto de molleja de pollo (pH 2,6), mientras que, de acuerdo a Conway et al. (1987), cepas de esta misma especie, pero aisladas del tracto digestivo de humanos, demostraron mayor tolerancia ácida en el ambiente gástrico (pH 2,5).

En base a los resultados obtenidos a partir de la evaluación de viabilidad a lo largo del TGI (tolerancia a bilis, tolerancia a pH estomacal y resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal *in vitro*), se seleccionaron los aislados B1, Y1, C2, C5, C9, B7, Y9, C10, Y11, Y12, C18, C27 y C28 para identificarlas y continuar con su caracterización probiótica.

En la **Tabla 5** se resumen las características evaluadas de cada aislado.

Tabla 5. Viabilidad a lo largo del TGI de los aislados B1, Y1, C2, C5, C9, B7, Y9, C10, Y11, Y12, C18, C27 y C28, por medio de la evaluación de la tolerancia a bilis, tolerancia a pH estomacal y resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal *in vitro*.

Aislado	Tolerancia a bilis (puntaje)	Tolerancia al pH estomacal (%)	Supervivencia al TGI (%)
B1	13,5	43,2	1,9**
Y1	15	73,8	50*
C2	12	100	1,7**
C5	15	90,7	7,5*
C9	15	17,2	40,4*
B7	7,5	-	33,9*
Y9	5	-	17,7*
C10	7,5	-	100*
Y11	15	-	100*
Y12	15	-	49*
C18	12,5	-	45,5*
C27	-	-	100*
C28	-	-	100*
Coco 1	-	-	19*
Coco 2	-	-	5*
Coco 3	-	-	1**

(-): no fue evaluado ese parámetro.

* La concentración microbiana disminuyó menos de 1 orden logarítmico al finalizar el pasaje por las condiciones simuladas del TGI *in vitro*. ** La concentración microbiana disminuyó entre 1 y 2 órdenes logarítmicos al finalizar el pasaje por las condiciones simuladas del TGI *in vitro*.

1.3.3 Extracción de ADN, identificación molecular y secuenciación

Los métodos moleculares son poderosas herramientas para la identificación de bacterias y son ampliamente utilizados en reemplazo de los métodos tradicionales.

Para la primera etapa, se evaluaron diferentes metodologías de extracción de ADN que fueron detalladas en la **Sección 1.2.5 (Materiales y Métodos)**, de acuerdo con los protocolos utilizados comúnmente en el laboratorio para obtener el material genético de las bacterias. Sin embargo, la única técnica que proporcionó resultados satisfactorios fue en la que se utilizó LiCl, el cual es un agente que se utiliza para la desestabilización de proteínas.

Uno de los pasos más importantes en la metodología molecular es la selección de los oligonucleótidos. Tradicionalmente, se utilizan los genes que codifican para el ARNr 16S como molécula *target* para la construcción de oligonucleótidos universales y específicos. Esta preferencia proviene del hecho de que los genes de la subunidad ribosomal menor (SSU) del ARNr están compuestos por una estructura tipo mosaico donde se alternan

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

regiones no variables, relativamente conservadas, con regiones altamente variables (regiones V). En este caso, se utilizaron los oligonucleótidos 518R y 338F, que generan amplicones de 200 pb aproximadamente (Muyzer et al., 1993).

Se identificaron los aislados seleccionados, según género y especie, y los resultados se presentan en la **Tabla 6**. A modo de ejemplo, se presentan algunos gráficos de calidad y secuencias obtenidas en la **Sección 4** del **Apéndice 2**.

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

Tabla 6. Identificación de los aislados seleccionados mediante secuenciación de amplicones obtenidos a partir de la amplificación de ADN total con los oligonucleótidos 518R y 338F.

Aislado	Resultado de la secuenciación	Referencia (GenBank)
B1	<i>L. salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i> strain DSM 103789 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MN537462.1)
Y1	<i>L. salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i> strain DSM 103789 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MN537462.1)
C2	<i>L. salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i> strain DSM 103789 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MN537462.1)
C5	<i>L. salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i> strain DSM 103789 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MN537462.1)
C9	<i>L. agilis</i>	<i>Lactobacillus agilis</i> strain La3, complete genome (CP016766.1)
B7	<i>L. johnsonii</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i> strain IDCC9203 chromosome, complete genome (CP031701.1)
Y9	<i>L. johnsonii</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i> strain IDCC9203 chromosome, complete genome (CP031701.1)
C10	<i>L. salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i> strain DSM 103789 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MN537462.1)
Y11	<i>L. reuteri</i> / <i>L. vaginalis</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i> strain reuteri chromosome, complete genome (CP045049.1) / <i>Lactobacillus vaginalis</i> strain LV515 chromosome, complete genome (CP045240.1)
Y12	<i>L. reuteri</i> / <i>L. vaginalis</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i> strain reuteri chromosome, complete genome (CP045049.1) / <i>Lactobacillus vaginalis</i> strain LV515 chromosome, complete genome (CP045240.1)
C18	<i>E. coli</i> / <i>Shigella boydii</i> / <i>Shigella flexneri</i>	<i>Escherichia coli</i> strain AUSMDU00002545 chromosome, complete genome (CP045975.1) / <i>Shigella sonnei</i> strain AUSMDU00010534 chromosome, complete genome (CP045932.1) / <i>Shigella flexneri</i> 2a strain AUSMDU00010535 chromosome, complete genome (CP045941.1)
C27	<i>E. coli</i> / <i>Shigella boydii</i> / <i>Shigella flexneri</i>	<i>Escherichia coli</i> strain AUSMDU00002545 chromosome, complete genome (CP045975.1) / <i>Shigella sonnei</i> strain AUSMDU00010534 chromosome, complete genome (CP045932.1) / <i>Shigella flexneri</i> 2a strain AUSMDU00010535 chromosome, complete genome (CP045941.1)
C28	<i>E. coli</i> / <i>Shigella boydii</i> / <i>Shigella flexneri</i>	<i>Escherichia coli</i> strain AUSMDU00002545 chromosome, complete genome (CP045975.1) / <i>Shigella sonnei</i> strain AUSMDU00010534 chromosome, complete genome (CP045932.1) / <i>Shigella flexneri</i> 2a strain AUSMDU00010535 chromosome, complete genome (CP045941.1)
Coco 1	<i>Enterococcus hirae</i> / <i>E. faecium</i> / <i>E. durans</i>	-
Coco 2	<i>Enterococcus hirae</i> / <i>E. faecium</i> / <i>E. durans</i>	-
Coco 3	<i>Enterococcus hirae</i> / <i>E. faecium</i> / <i>E. durans</i>	-

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

De un total de trece secuencias analizadas, las cepas B1, Y1, C2, C5 y C10 presentaron una similitud del 100 % con cepa tipo *Lactobacillus salivarius*, las cepas B7 e Y9 presentaron 100 % de similitud con cepa tipo *Lactobacillus johnsonii* y la cepa C9 presentó 100% de similitud con cepa tipo *Lactobacillus agilis*. Para el caso de las cepas Y11 e Y12, se obtuvieron dos posibles resultados no concluyentes en cuanto a su identidad (*L. reuteri* / *L. vaginalis*); por lo que la identificación se complementó mediante la caracterización fenotípica de acuerdo al perfil de fermentación de azúcares (**Sección 1.3.6**). Las cepas C18, C27 y C28 fueron identificadas (no concluyente) como *Escherichia fergusonii* / *E. coli* / *Shigella boydii*, por lo que no se seleccionaron para continuar con el estudio ya que no estuvo dentro de nuestros objetivos aislar estos géneros microbianos.

Los órganos/regiones que forman parte del tracto gastrointestinal (TGI) aviar consisten en el buche, el proventrículo, la molleja, el duodeno, el yeyuno, el íleon, los ciegos, el intestino grueso y la cloaca. Cada órgano/región posee diferentes funciones que afectan la dinámica de la microbiota; otros factores que condicionan la composición de la microbiota son la edad de las aves y la composición de la dieta (Apajalahti et al., 2004; Rehman et al., 2007; Yeoman et al., 2012; Stanley et al., 2014; Oakley et al., 2014; Pan & Yu, 2014; Deusch et al., 2015; Kogut & Oakley, 2016; Shang et al., 2018). Por lo que era esperable obtener, en esta Tesis, aislados del género *Lactobacillus* de diferentes especies.

En otras investigaciones se han aislado diferentes especies del género *Lactobacillus* a partir del tracto gastrointestinal de pollos, entre las que se pueden mencionar *L. plantarum*, *L. agilis*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. fermentum*, y *L. crispatus* (Abbas Hilmi et al., 2007; Lin et al., 2007; Hammons et al., 2010; Noohi et al., 2014).

De acuerdo a Ranjitkar et al. (2016), las especies *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. crispatus* y *L. salivarius* están presentes en todos los segmentos evaluados del TGI (buche, molleja, íleon y ciegos) a lo largo del ciclo de crianza de los pollos broiler, siendo *L. johnsonii* la especie dominante; *L. reuteri* y *L. crispatus* predominaron durante el período de crecimiento temprano (hasta el día 15), mientras que *L. salivarius* dominó la fase de crecimiento final (hasta el día 36 aproximadamente).

Kobierecka et al. (2017) reportaron que la especie de *Lactobacillus* más abundante en muestras de materia fecal de pollos, tanto en producción a gran escala (granjas) como en pequeños gallineros, fue *L. salivarius*, independientemente del método de cría. En la cría a gran escala, *L. salivarius* (68 %) y *L. agilis* (12 %) fueron las especies más frecuentes dentro del género; en cambio, a pequeña escala, la diversidad de especies fue mayor siendo *L. salivarius* (29 %) la especie dominante, seguida de *L. reuteri* (24 %)

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

y *L. plantarum* (23 %). Otras especies, como *L. johnsonii* (6 %), *L. oris* (3 %), *L. agilis* (5 %) y *L. kitasatonis* (5 %), aparecieron con menos frecuencia. Las especies restantes (*L. curvatus*, *L. crispatus*, *L. fermentum* y *L. ingluviei*) representaron alrededor del 1 % de todos los aislamientos.

En otro estudio, se aislaron un total de 46 bacterias del género *Lactobacillus* a partir de la cloaca y materia fecal de pollos broilers y gallinas, de los cuales se identificaron siete especies: *L. salivarius* (n = 15), *L. johnsonii* (n = 11), *L. crispatus* (n = 5), *L. ingluviei* (n = 5), *L. reuteri* (n = 5), *L. oris* (n = 2) y *L. saerimneri* (n = 3) (Dec et al., 2018).

L. salivarius es considerada la especie dominante en el intestino y ciegos de pollos (Pascual et al., 1996; Gusils et al., 1999), la cual ha sido aislada previamente del tracto gastrointestinal de estos animales y se han estudiado sus características probióticas *in vitro* e *in vivo* (Garriga et al., 1998; Rondón et al., 2008; Shokryazdan et al., 2017). Esta especie posee un perfil de fermentación de azúcares homofermentativo.

Las características probióticas de la especie *L. reuteri* han sido estudiadas previamente (Edens et al., 1997; Yu et al., 2007; Wang et al., 2014; Nakphaichit et al., 2018). Esta especie mesófila posee un perfil de fermentación de azúcares heterofermentativo y puede crecer tanto en condiciones de aerobiosis como anaerobiosis (anaerobia facultativa). Además, posee alta resistencia a las sales biliares y al ácido, lo cual le confiere la habilidad de habitar el tracto gastrointestinal de humanos, cerdos y pollos. *L. reuteri* produce, a partir del metabolismo anaerobio del glicerol, la reuterina, una sustancia antimicrobiana que inhibe el crecimiento de otras bacterias, hongos y protozoos. Dentro de sus capacidades antimicrobianas también se ha descrito la colonización de las células epiteliales, evitando así la colonización por otras bacterias. Por su parte, *L. agilis*, es una especie mesófila con un perfil de fermentación de azúcares heterofermentativo (facultativo). Casey et al. (2004) y Van Coillie et al. (2007) han demostrado el efecto inhibitorio de esta especie frente a diferentes cepas de *Salmonella sp.*

Por último, una de las especies de lactobacilos más reportadas en cuanto a exclusión competitiva contra patógenos en pollos es *L. johnsonii* (La Ragione et al., 2004; Van Coillie et al., 2007; Olnood et al., 2015; Mañes-Lázaro et al., 2017). Esta especie tiene un perfil de fermentación de azúcares homofermentativo obligatorio y posee la capacidad de crecer en presencia de NaCl al 4 % p/v. Es una bacteria anaerobia, productora de ácido láctico a partir de la fermentación de disacáridos y hexosas. Además, es capaz de producir bacteriocinas como Lactacin F, las cuales tienen efecto antimicrobiano frente a otros microorganismos.

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

Respecto a *Enterococcus* sp., hay numerosos trabajos de aislamiento de este género a partir de muestras de origen aviar (materia fecal, carcasas, camas utilizadas). De acuerdo a Cassenego et al. (2011), a partir de materia fecal, el mayor número de especies aisladas fue el siguiente: *E. faecalis* fue la especie más prevalente (40 %), seguida de *E. casseliflavus* / *E. gallinarum* (10,8 %), *E. mundtii* (10.8 %), *E. faecium* (10,8 %), *E. columbae* (5,8%) y *E. gallinarum* (4,2 %). Otras especies identificadas, como *E. hirae* y *E. durans*, se encontraron en bajos porcentajes. Estas especies también fueron reportadas por otros autores, como Hwang et al. (2009), Fracalanza et al. (2007) y Debnam et al. (2005). La presencia de especies de *Enterococcus* varía con la edad de las aves: en las más jóvenes, las especies más prevalentes son *E. faecalis* y *E. faecium*; con la madurez de las aves, hay una disminución en la concentración de *E. faecium*, seguida de *E. faecalis*, lo que permite el crecimiento de otras especies (Devriese et al., 2006).

A partir de este punto, los aislados fueron denominados según lo expresado en la Tabla 7. Los aislados identificados como *E. coli* / *Shigella boydii* / *Shigella flexneri* (C18, C27 y C28) fueron descartados del estudio.

Tabla 7. Denominación de los aislados seleccionados.

Aislado	Nombre final
B1	<i>L. salivarius</i> CM-CIDCA 1231B
Y1	<i>L. salivarius</i> CM-CIDCA 1232Y
C2	<i>L. salivarius</i> CM-CIDCA 1233C
C5	<i>L. salivarius</i> CM-CIDCA 1234C
C9	<i>L. agilis</i> CM-CIDCA 1235C
B7	<i>L. johnsonii</i> CM-CIDCA 1236B
Y9	<i>L. johnsonii</i> CM-CIDCA 1237Y
C10	<i>L. salivarius</i> CM-CIDCA 1238C
Y11	<i>L. reuteri</i> / <i>L. vaginalis</i> CM-CIDCA 1239Y
Y12	<i>L. reuteri</i> / <i>L. vaginalis</i> CM-CIDCA 12310Y
Coco 1	<i>Enterococcus</i> sp. 1
Coco 2	<i>Enterococcus</i> sp. 2
Coco 3	<i>Enterococcus</i> sp. 3

1.3.4 Ensayo de adhesión a células intestinales Caco-2/TC-7

La capacidad de adhesión al epitelio intestinal es relevante para evaluar la potencialidad probiótica de una cepa (Monteagudo-Mera et al., 2019). Esta capacidad podría dar lugar a la persistencia transitoria en el TGI, lo cual se relaciona directamente con otras propiedades probióticas deseadas, como la disminución en los niveles de colesterol (Marteau, 2000), la inhibición de la adhesión de patógenos al epitelio intestinal (Mack et al., 1999; Fernández et al., 2003; Lee et al., 2003; Santos et al., 2003) y con procesos inmunomoduladores (Schiffrin et al., 1995; Maldonado Galdeano et al., 2007).

La adhesión *in vitro* a líneas celulares de epitelio intestinal humano de cepas de *Lactobacillus* de diferentes orígenes ha sido descrita previamente (Kaewnopparat et al., 2013), donde pueden mencionarse las cepas *L. johnsonii* La1 (Bernet et al., 1994), *L. rhamnosus* GG (Zomitti et al., 2017), *L. casei* (Maragkoudakis et al., 2006), *L. fermentum* SK5 (Tulumoglu et al., 2014), *L. agilis* (Gil et al., 2010) y *L. salivarius* SMXD51 (Messaoudi et al., 2012).

Por lo tanto, en esta sección del trabajo se evaluó si las bacterias aisladas presentaban esta capacidad, utilizando la línea celular Caco-2/TC-7 (**Sección 1.2.6.1**). Las células Caco-2 expresan características del epitelio intestinal normal y son un excelente sistema para los estudios de adhesión ya que tienen una buena correlación con los resultados *in vivo* (Pinto et al., 1983; Crociani et al., 1995; Sambuy et al., 2005).

Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 3**:

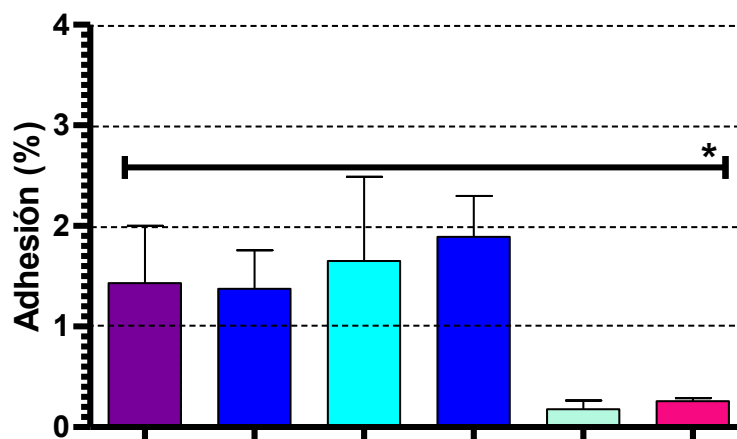


Figura 3. Adhesión de los lactobacilos a células Caco-2/TC7 en cultivo incubadas durante 7 días. *L. salivarius* 1231B (■), *L. salivarius* 1232Y (■), *L. salivarius* 1233C (■), *L. salivarius* 1234C (■), *L. agilis* 1235C (■) y *L. plantarum* CIDCA 83114 (■).

Los resultados reflejan el promedio de tres experimentos independientes. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar DE. Evaluación estadística mediante ANOVA de un solo factor, seguido de test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha = 0,05$). *La línea sólida (horizontal) indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las cepas ($p < 0,05$).

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

De acuerdo a estos resultados, no hubo diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de adhesión de los 6 lactobacilos evaluados, incluyendo la cepa de referencia *L. plantarum* CIDCA 83114. Las 4 cepas de *L. salivarius* fueron los aislados que presentaron mayor capacidad de adhesión.

Se ha comprobado que la capacidad de adhesión a células es un proceso cepa-específico, independientemente del origen de la cepa (Chauvière et al., 1992; Jacobsen et al., 1999).

Luego de alcanzar la porción inicial del intestino delgado, las bacterias probióticas son capaces de vivir por un período corto de tiempo en estado no proliferativo. Para establecerse como habitantes permanentes de la mucosa, deben tener la capacidad de adherirse a las células epiteliales para evitar ser removidas y eliminadas por los mecanismos de “limpieza” que posee el intestino (peristalsis, movimientos de fluidos, etc). La adhesión bacteriana involucra una fase inicial, no específica e irreversible, de interacción física entre ambas superficies seguida de una fase, específica e irreversible, mediada por elementos de adhesión (principalmente, proteínas de la superficie bacteriana) y por receptores específicos de la célula eucariota, donde estas interacciones se ven favorecidas por la presencia de cationes di y trivalentes que actúan como puentes iónicos entre la superficie bacteriana y el epitelio intestinal (Chauviere et al., 1992; Tuo et al., 2013). Las interacciones se encuentran reguladas por la especificidad entre la bacteria y las propiedades del huésped; algunos microorganismos son huésped-específicos, pero otros pueden ser capaces de colonizar más de una especie de mamíferos (Villareal, 2012).

Messaoudi et al. (2012) hallaron que la cepa *L. salivarius* SMXD51 (de origen aviar) presentó un porcentaje de adhesión a la línea celular Caco-2/TC7 del 1 %, respecto al inóculo inicial; también fue comprobado que dicho aislado poseía otras características probióticas, como la tolerancia a las condiciones gastrointestinales y la capacidad de protección de la integridad de la barrera celular epitelial. El porcentaje de adhesión obtenido para *L. salivarius* SMXD51 fue similar al que hallaron Kirtzalidou et al. (2011), con otra cepa de *L. salivarius*. Estos dos resultados coinciden con los encontrados en esta Tesis, donde los porcentajes de adhesión de los aislados identificados como *L. salivarius* estuvieron en el rango de 1,37 % - 1,89 %.

Zommiti et al. (2017) encontraron que la cepa *L. curvatus* DN 317, aislada de ciegos de pollos, posee un nivel de adhesión a las células intestinales Caco-2 del 16 %, valor superior al hallado para la cepa utilizada como control *L. rhamnosus* GG (7 %). En tanto, otros autores demostraron que la cepa *L. plantarum* VJC38, aislada del buche de pollos

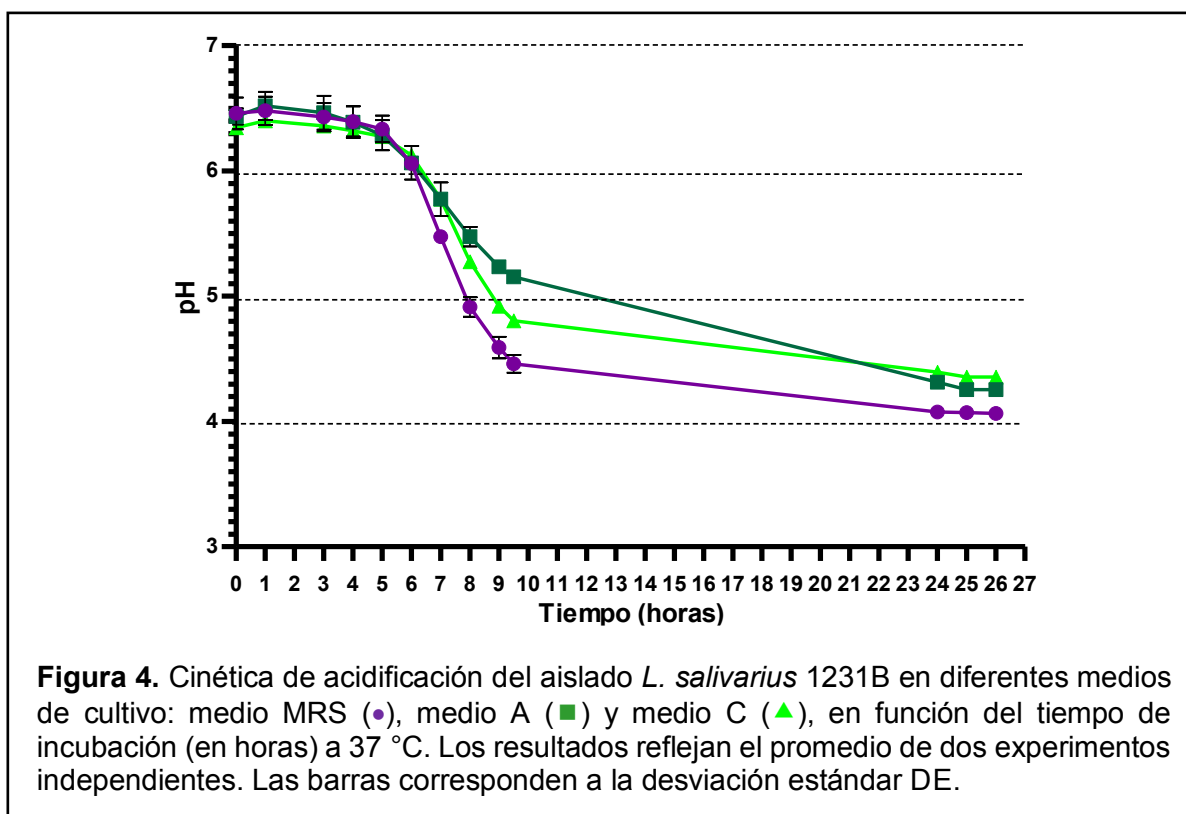
de 7 semanas de vida, obtuvo un porcentaje de adhesión a células Caco-2 de 11 % (Nallala & Jeevaratnam, 2018).

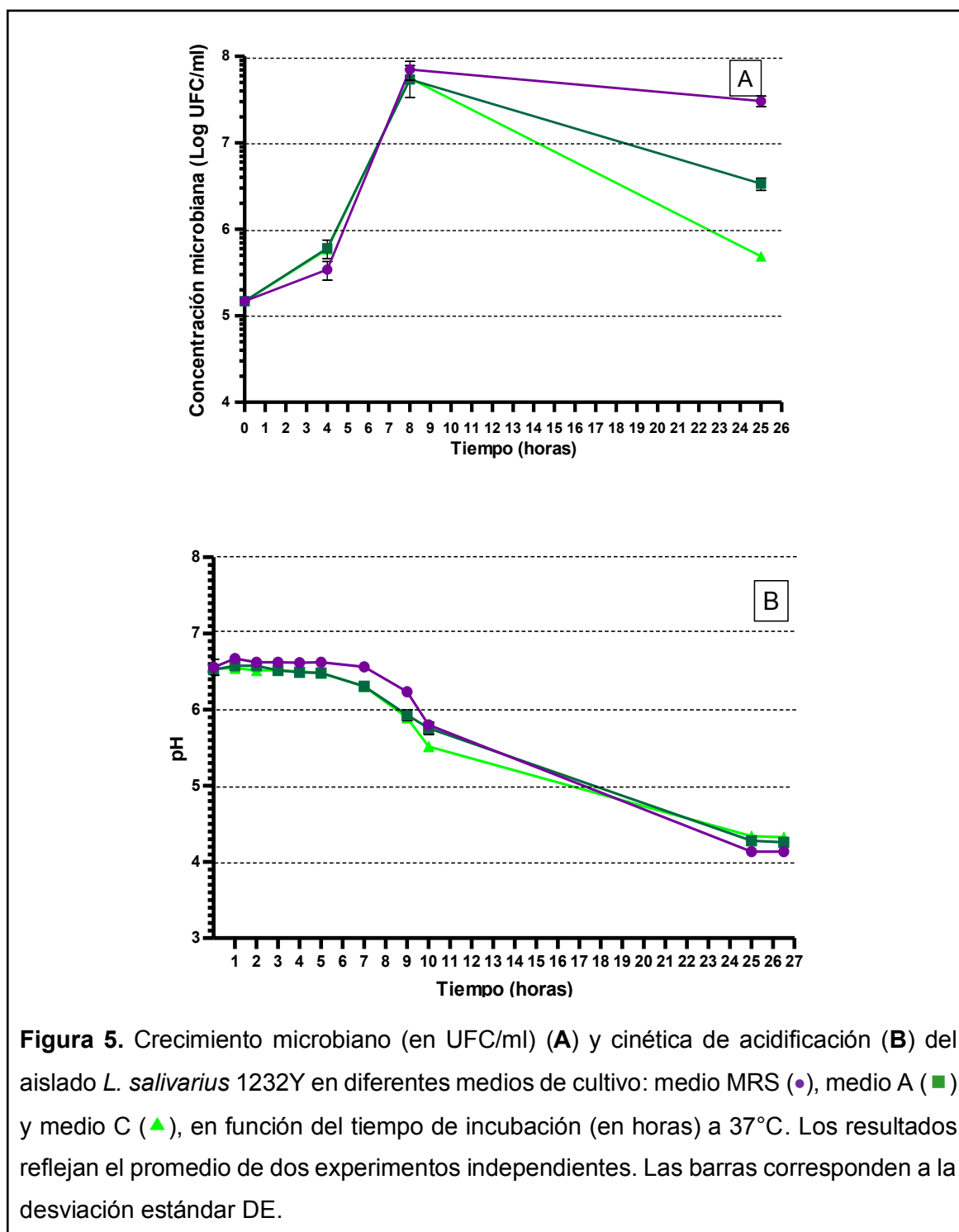
Por lo que, de acuerdo a los resultados obtenidos por numerosos autores, se puede concluir que la adhesión a células epiteliales *in vitro* es un fenómeno cepa específico, y que los porcentajes de adhesión suelen ser muy variables. Sin embargo, es un método válido para conocer la capacidad de adhesión de una cepa y poder usar esta característica para seleccionar la que más nos interesa. Con respecto a las cepas evaluadas en este estudio, las 4 cepas de *L. salivarius* presentaron mayor adhesión que la cepa probiótica *L. plantarum* 83114 incluida como referencia lo cual es un resultado muy alentador. Sin embargo, no pudimos detectar diferencias significativas entre ellas en cuanto a la adhesión a células *in vitro*.

1.3.5 Crecimiento en diferentes medios de cultivo

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el uso de los lactobacilos como probióticos en la producción aviar a gran escala, lo cual implica el empleo de medios de cultivo en grandes cantidades. Si bien el medio MRS es el medio de cultivo comercial por excelencia para el crecimiento de bacterias lácticas, su uso a escala industrial implica grandes costos. Para encontrar una alternativa más económica se evaluó el crecimiento de algunos de los lactobacilos en medios alternativos de menor costo, constituidos por leche en polvo y extracto de levadura y otros con peptona y extracto de levadura (ver **Apéndice 1**). Una vez evaluados estos medios y determinado el crecimiento y acidificación de los microorganismos aislados, se evaluaron el permeado de suero (desecho de la industria láctea) y permeado de suero suplementado con extracto de levadura, con el objetivo de encontrar el medio de cultivo de menor costo, pero donde los microorganismos puedan crecer apropiadamente y así obtener la mayor biomasa en el menor tiempo.

En la primera parte, se evaluó la cinética de crecimiento de *L. salivarius* 1231B, *L. salivarius* 1232Y, *L. salivarius* 1234C y *L. agilis* 1235C en los medios A y C (composición detallada en **Apéndice 1**), utilizando el medio MRS como medio control. Los microorganismos se reactivaron en MRS mediante dos pasajes sucesivos, seguidos de la inoculación en el medio a evaluar, incubando a 37 °C por 26 horas. Se realizaron cinéticas de acidificación y recuentos del crecimiento microbiano en placa a lo largo del tiempo de incubación (**Figuras 4, 5, 6 y 7**).





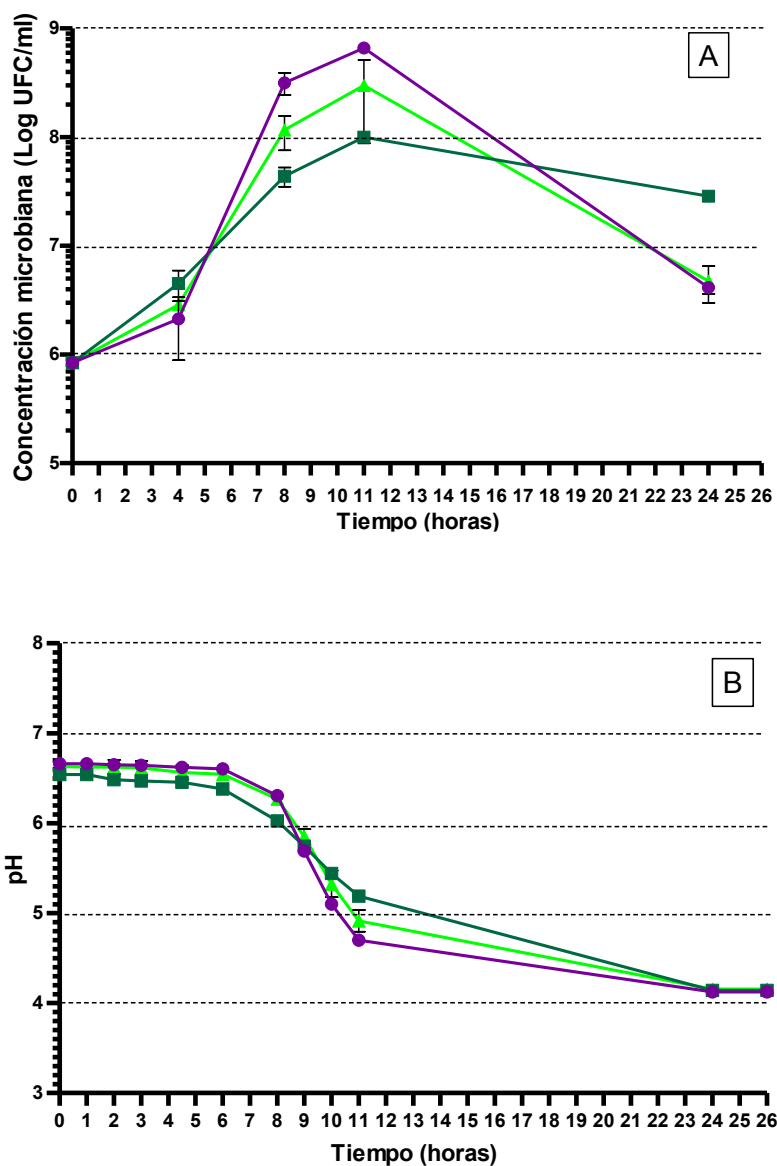
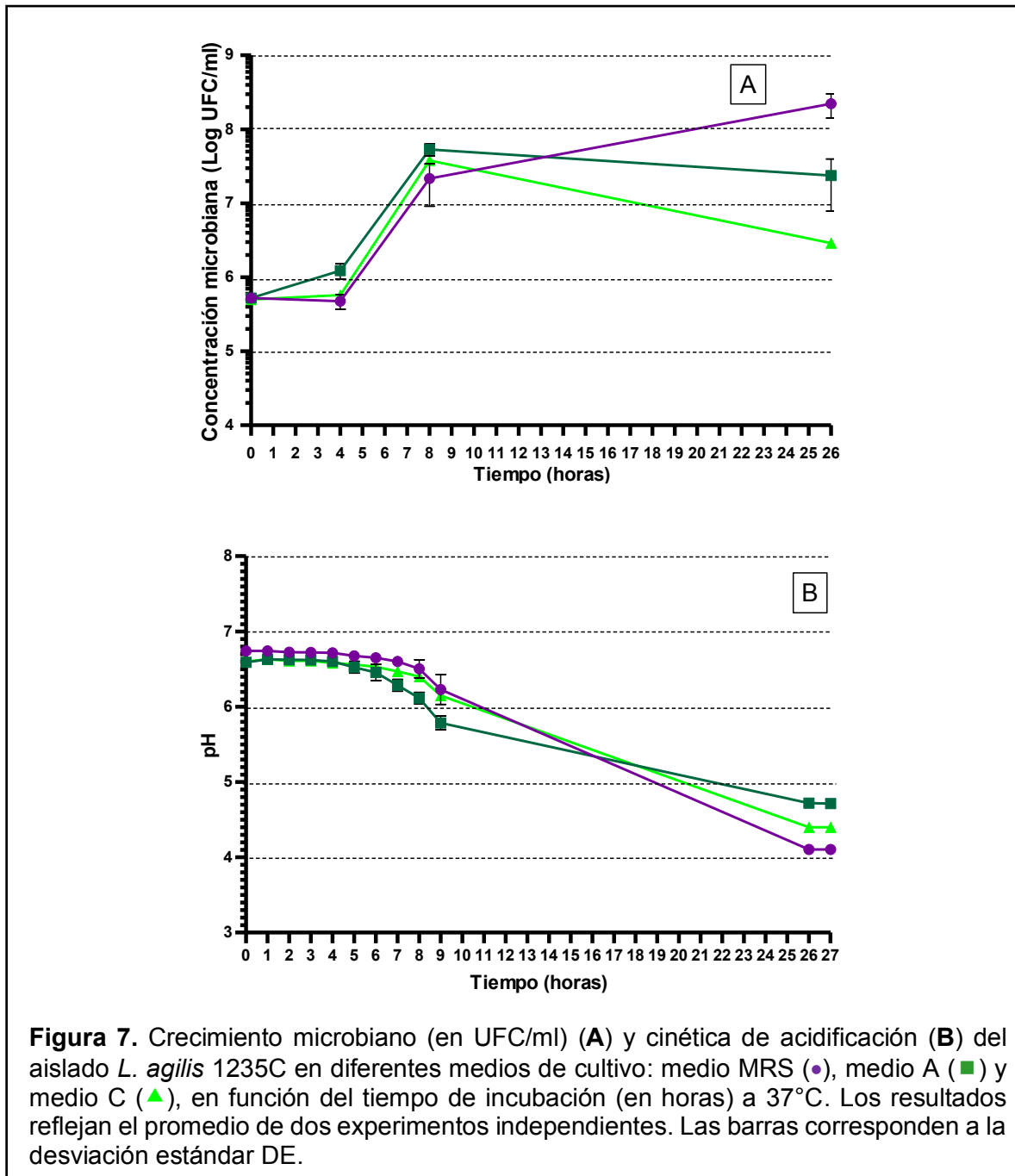


Figura 6. Crecimiento microbiano (en UFC/ml) (A) y cinética de acidificación (B) del aislado *L. salivarius* 1234C en diferentes medios de cultivo: medio MRS (●), medio A (■) y medio C (▲), en función del tiempo de incubación (en horas) a 37°C. Los resultados reflejan el promedio de dos experimentos independientes. Las barras corresponden a la desviación estándar DE.



Todos los aislados fueron capaces de crecer y acidificar los medios de cultivo evaluados. Los pH finales estuvieron en promedio cerca de 4,1 en medio MRS y 4,3 en los otros medios evaluados. Los máximos recuentos se obtuvieron en el medio MRS, a excepción de *L. salivarius* 1234C, el cual alcanzó una mayor concentración en el medio A (3×10^7 UFC/ml) a las 24 horas. Respecto a los medios formulados, el medio A permitió obtener las mayores concentraciones. El mínimo pH obtenido (promedio 4,1) también se alcanzó en MRS y fue levemente inferior respecto a los medios de cultivo evaluados.

En esta Tesis, las concentraciones encontradas de los aislados en medio MRS estuvieron un orden por debajo que los informados por Ren et al. (2019), donde a las 12

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

horas de incubación a 37 °C, los recuentos de *L. salivarius* y *L. agilis* fueron del orden logarítmico de $8,8 \pm 0,1$ y $8,9 \pm 0,1$, respectivamente, y a las 24 horas, la concentración alcanzó el máximo orden logarítmico de $9,0 \pm 0,1$ y $9,1 \pm 0,1$, respectivamente. Por otro lado, *L. salivarius* 1232Y y 1234C alcanzaron la máxima concentración a menor tiempo respecto a Ren et al. (2019), entre las 8 y 11 horas de incubación.; en cambio, *L. agilis* 1235C, obtuvo su mayor concentración en MRS a las 26 horas de fermentación.

Por otro lado, las concentraciones obtenidas por los aislados de *L. salivarius* y *L. agilis* se encuentran por debajo de las informadas para la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114, la cual fue utilizada en ensayos anteriores como cepa de referencia (**Sección 1.3.2**). De acuerdo a Correa Franco (2018), la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114 alcanzó un recuento a las 24 horas de fermentación a 30 °C de $1,2 \pm 0,6 \times 10^{10}$ UFC/ml, valor que se mantuvo hasta las 48 horas de fermentación ($1,6 \pm 0,8 \times 10^{10}$ UFC/ml).

El crecimiento de los aislados en los medios de cultivo a 37 °C fue monitoreado de acuerdo a dos parámetros: la concentración bacteriana y el valor de pH. El objetivo de medir el pH fue poder determinar la capacidad acidificante de las bacterias ácido-lácticas en el medio de cultivo. En este caso, el factor determinante para la selección del medio de cultivo fue el mayor recuento posible en el menor tiempo, dado que serán los microorganismos vivos los que se administrarán a los pollos durante su crianza. Por lo que, a fin de facilitar la preparación del futuro producto probiótico a escala laboratorio, se busca obtener cultivos con la máxima concentración posible (el mayor recuento posible) (Hrnčár et al., 2014; Atela et al; 2019).

Respecto al crecimiento de cada aislado, *L. salivarius* 1232Y obtuvo al final de la incubación, en el medio MRS, un recuento microbiano ($3,0 \pm 0,5 \times 10^7$ UFC/ml) de un orden mayor respecto al medio A ($3,4 \pm 0,6 \times 10^6$ UFC/ml), y dos órdenes por encima del medio C ($4,8 \pm 0,3 \times 10^5$ UFC/ml). Los máximos recuentos obtenidos fueron entre $4 - 8 \times 10^7$ UFC/ml a la hora 8 de incubación en los medios de cultivo. *L. salivarius* 1234C obtuvo el mayor valor de concentración microbiana utilizando el medio A, donde su valor estuvo un orden ($2,9 \pm 2,8 \times 10^7$ UFC/ml) por encima de los obtenidos con el medio C y con el medio tradicional (MRS). Sin embargo, las concentraciones más altas se obtuvieron a menores tiempos de incubación (11 horas), al igual que *L. salivarius* 1232Y, las cuales fueron $6,8 \pm 6,5 \times 10^8$ UFC/ml, $1,0 \pm 1,0 \times 10^8$ UFC/ml y $1,5 \pm 4,5 \times 10^8$ UFC/ml en el medio MRS, medio A y medio C, respectivamente.

Por otro lado, a partir del crecimiento de *L. agilis* 1235C, se halló un mayor recuento microbiano en MRS ($1,6 \pm 2,8 \times 10^8$ UFC/ml), respecto al medio A ($1,2 \pm 3,5 \times 10^7$ UFC/ml) y medio C ($2,9 \times 10^6$ UFC/ml) al máximo tiempo de fermentación.

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

De acuerdo a los recuentos obtenidos, el medio de cultivo con el cual se alcanzan las mayores concentraciones es el MRS. Respecto a los medio formulados, el medio de cultivo A serían más apropiado que el medio C para realizar un escalado y obtener los microorganismos a nivel industrial para su uso en la producción aviar. Las diferencias que se observan, en referencia a la concentración obtenida en los dos medios, pueden deberse a la composición: la formulación del medio A contiene leche descremada en polvo, la cual aporta, además de la fuente de C (lactosa), albúminas, globulinas y caseínas. Estas proteínas son una importante fuente de nitrógeno, las cuales podrían generar el aumento de biomasa.

Una vez evaluados los medios A y C, se procedió a determinar la capacidad de crecimiento y de acidificación de los aislados en un medio más pobre a nivel nutricional: permeado de suero (PS) con y sin adición de extracto de levadura. El PS es un desecho de la industria láctea que podría utilizarse como un medio de cultivo, de bajo costo, para el crecimiento de los microorganismos. Además, con el incremento en los niveles de producción, los avances tecnológicos en materia de industrialización, el crecimiento del mercado de consumo y la creciente necesidad de preservar el ambiente de agentes contaminantes, el PS está siendo reciclado por otras vías, con un mayor valor agregado (González Siso, 1996; Prazeres et al., 2012). Anteriormente, Cejas et al. (2017) evaluaron el crecimiento de algunos de estos aislados (*L. salivarius* CM-CIDCA 1231B y CM-CIDCA 1232Y) en un medio de cultivo obtenido a partir de otro subproducto de otra industria alimentaria (las malterías). A partir de los brotes de malta utilizados, llamados comúnmente raicillas, se formuló un medio de cultivo para el desarrollo de los aislados, detectando un crecimiento comparable al obtenido en el medio MRS.

Respecto al PS, estudios previos en nuestro grupo de trabajo han demostrado que es un medio de cultivo que puede ser utilizado para el crecimiento de distintos microorganismos, como bacterias lácticas y levaduras presentes en gránulos de kefir, y para la conservación bacteriana por deshidratación (León Peláez, 2013; Gamba, 2015; Hugo et al., 2016; Correa Franco, 2018).

Los microorganismos se reactivaron en MRS mediante dos pasajes sucesivos, seguido de la inoculación en PS, incubando por 24 horas a 37 °C. Al inicio y al final de la incubación, se determinó la concentración de microorganismos y el pH; adicionalmente, se calculó la relación entre el recuento obtenido a las 24 horas y al tiempo cero. Los resultados obtenidos se expresan en las siguientes tablas (**Tabla 8** y **Tabla 9**):

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

Tabla 8. Determinación de la concentración microbiana y acidez al inicio y al final de la incubación de bacterias ácido lácticas aisladas del TGI de pollos en permeado de suero (formulado en concentración de 5 % p/v). *

AISLADOS	Tiempo inicial		Tiempo 24 horas		Relación recuento 24 h / recuento t0
	pH	Recuento	pH	Recuento	
<i>L. salivarius</i> 1231B	5,5	1,8 x 10 ⁷	3,8	3,0 x 10 ⁸	16,6 (4)
<i>L. salivarius</i> 1232Y	5,5	1,6 x 10 ⁷	3,8	3,3 x 10 ⁸	21,3 (3)
<i>L. salivarius</i> 1233C	5,6	1,5 x 10 ⁷	4,1	3,7 x 10 ⁸	23,9 (2)
<i>L. salivarius</i> 1234C	5,5	1,9 x 10 ⁷	3,8	1,3 x 10 ⁸	6,8 (6)
<i>L. agilis</i> 1235C	5,5	2,2 x 10 ⁷	3,8	3,7 x 10 ⁸	16,4 (5)
<i>L. johnsonii</i> 1236B	5,6	2,7 x 10 ⁷	5,0	3,3 x 10 ⁹	123,7 (1)
<i>L. johnsonii</i> 1237Y	5,6	3,8 x 10 ⁷	4,8	3,3 x 10 ⁷	0,8
<i>L. salivarius</i> 1238C	5,6	2,4 x 10 ⁷	4,9	4,7 x 10 ⁷	1,9
<i>L. reuteri / vaginalis</i> 1239Y	5,6	2,0 x 10 ⁷	5,3	6,7 x 10 ⁶	0,3
<i>L. reuteri / vaginalis</i> 12310Y	5,6	2,2 x 10 ⁷	5,4	6,7 x 10 ⁶	0,3

*pH del medio sin inocular= 5,81.

De acuerdo a lo observado en la **Tabla 8**, la acidificación del medio es variable y depende de cada aislado: *L. salivarius* 1231B, *L. salivarius* 1232Y, *L. salivarius* 1233C, *L. salivarius* 1234C y *L. agilis* 1235C disminuyen el pH de alrededor de 5,5 hasta valores cercanos e inferiores a 4. Sin embargo, en el caso de los cultivos realizados con los aislados *L. reuteri / vaginalis* 1239Y y *L. reuteri / vaginalis* 12310Y, el pH final fue cercano al inicial. El descenso de pH observado en ciertos casos puede atribuirse a la utilización de lactosa como fuente de carbono fermentable, a partir de la cual se produce ácido láctico, principal producto obtenido durante la fermentación y, a su vez, el principal metabolito que causa el descenso del pH (Fu & Mathews, 1999; Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000).

Respecto a la concentración de los microorganismos al inicio y al final de la fermentación en PS, *L. johnsonii* 1236B fue el aislado que mostró el mayor aumento de concentración (dos órdenes de magnitud), alcanzando 124 veces su valor inicial; respecto a la disminución de pH, podría deberse, principalmente, a la liberación de metabolitos bacterianos. Todos los aislados de *L. salivarius* (1231B, 1232Y, 1233C y 1234C) fueron capaces de aumentar su concentración inicial entre 6 y 24 veces; a excepción de *L. salivarius* 1238C, el cual solo aumentó su recuento, aproximadamente, 2 veces. El

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

aislado *L. agilis* 1235C aumentó 16 veces su concentración; mientras que para el resto de los aislados (*L. johnsonii* 1237Y, *L.reuteri* / *vaginalis* 1239Y y 12310Y) disminuyó, respecto al valor inicial.

En referencia a otros estudios en donde se empleó permeado de suero como medio de cultivo, se ha demostrado que microorganismos del kefir (especies de *L. plantarum*) son capaces de fermentar la lactosa y producir ácidos láctico y acético en permeado de suero, acidificando el medio hasta valores de pH alrededor de 3,5 a 3,7, y valores de concentración del orden de 10^8 UFC/ml, aumentando solamente 1,3 log por encima del inóculo inicial (León Pelaez, 2013; Hugo et al., 2016). En consonancia con estos resultados, la cepa *L. plantarum* (DSM 9843) alcanzó una concentración aproximada de 4×10^8 UFC/ml a las 24 horas de fermentación en medio PS (Golowzyc et al., 2013); y *L. rhamnosus* (*L. rhamnosus* 64) fue capaz de crecer en este medio, pero con un aumento de 1,3 log su concentración respecto al inóculo inicial, obteniendo un recuento de $1,0 - 1,1 \times 10^8$ UFC/ml en fase estacionaria (Lavari et al., 2015). De acuerdo a Aguirre-Ezkauriatza et al. (2010) una cepa de *L. casei* fue capaz de crecer en permeado de suero obtenido a partir de leche de cabra, con una concentración máxima de $5,2 \times 10^9$ UFC/ml a las 23 h de incubación a 37 °C.

De acuerdo con los datos obtenidos en esta Tesis y los estudios previos mencionados, se puede afirmar que el medio base permeado de suero es un medio de cultivo útil para el crecimiento de bacterias lácticas aunque, en algunos casos, el crecimiento pobre o limitado puede estar relacionado con su composición, donde la concentración de nitrógeno es muy baja (León Pelaez, 2013).

A fin de aumentar la disponibilidad de nutrientes en el medio base de permeado de suero, se adicionó extracto de levadura (1 % p/v), el cual es un suplemento rico en vitaminas (especialmente del complejo B), aminoácidos y otros factores de crecimiento. Los resultados obtenidos, en cuanto a concentración microbiana y acidez del medio de cultivo inoculado, se presentan en la **Tabla 9**.

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

Tabla 9. Determinación de la concentración microbiana y acidez al inicio y al final de la incubación de bacterias ácido lácticas aisladas del TGI de pollos en permeado de suero (formulado en concentración de 5 % p/v) suplementado con extracto de levadura (1 % p/v).

AISLADOS	Tiempo inicial		Tiempo 24 horas		Relación recuento 24 h / recuento t0
	pH	Recuento	pH	Recuento	
<i>L. salivarius</i> 1231B	5,6	4,3 x 10 ⁵	4,2	4,0 x 10 ⁷	93,0
<i>L. salivarius</i> 1232Y	5,6	3,0 x 10 ⁶	4,2	2,0 x 10 ⁷	6,6
<i>L. salivarius</i> 1233C	5,6	1,0 x 10 ⁶	4,3	4,1 x 10 ⁷	41,0
<i>L. salivarius</i> 1234C	5,6	8,6 x 10 ⁵	4,0	3,3 x 10 ⁷	38,7
<i>L. agilis</i> 1235C	5,6	6,8 x 10 ⁶	3,9	5,0 x 10 ⁸	73,5
<i>L. johnsonii</i> 1236B	5,6	2,1 x 10 ⁷	4,1	1,4 x 10 ⁸	6,8
<i>L. johnsonii</i> 1237Y	5,6	2,7 x 10 ⁷	4,0	2,6 x 10 ⁸	11,1
<i>L. salivarius</i> 1238C	5,6	7,7 x 10 ⁶	4,9	1,4 x 10 ⁸	18,1
<i>L. reuteri / vaginalis</i> 1239Y	5,6	7,7 x 10 ⁶	4,4	4,0 x 10 ⁷	5,1

Los aislados fueron capaces de crecer y acidificar el medio de cultivo y, en ciertos casos, alcanzaron valores de pH y concentración comparables a los obtenidos en el medio de crecimiento tradicional comercial (MRS) (Tabla 9). Especialmente, cuatro de los lactobacilos (*L. agilis* 1235C, *L. johnsonii* 1236B, *L. johnsonii* 1237Y y *L. salivarius* 1238C) alcanzaron una concentración entre 1,4 - 5 x 10⁸ UFC/ml a las 24 horas de cultivo a 37 °C.

En cuanto a la relación entre la concentración de los microorganismos al inicio y al final de la fermentación en este medio formulado, *L. salivarius* 1231B y *L. agilis* 1235C evidenciaron el mayor aumento en la concentración (dos órdenes de magnitud), alcanzando 93 y 74 veces su valor inicial, respectivamente. Los otros aislados de *L. salivarius* (1232Y, 1233C, 1234C y 1238C), fueron capaces de aumentar su concentración inicial entre 7 y 41 veces. Los aislados de *L. johnsonii* (1236B y 1237Y) aumentaron su concentración entre 7 y 11 veces respecto al recuento inicial. Y *L. reuteri / vaginalis* 1239Y aumentó 5 veces su concentración respecto al valor inicial.

De acuerdo a lo expuesto por Cui et al. (2012), la suplementación del medio base permeado de suero (6,8 % p/v) con extracto de levadura (0,3 % p/v) favoreció la producción de ácido láctico a partir de la fermentación con una cepa de *L. rhamnosus*, obteniéndose 2,4 veces más cantidad respecto al medio sin suplementar; adicionalmente, la máxima concentración microbiana obtenida fue 19 veces mayor en el medio suplementado. Utilizando una cepa de la misma especie (*L. rhamnosus* 64), Lavari et al. (2015) observó diferencias en la concentración microbiana utilizando el

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

medio suplementado con extracto de levadura (5×10^9 UFC/ml) respecto al medio base ($1,1 \times 10^8$ UFC/ml). Benaissa et al. (2017) evaluó el crecimiento de dos lactobacilos, *L. casei* CHTD27 y *L. plantarum* BH14, en PS suplementado con cantidades crecientes de extracto de levadura, obteniendo la máxima concentración de microorganismos ($2,2 \times 10^8$ UFC/ml) con 8 % p/v de extracto de levadura; utilizando 1% p/v de extracto de levadura (concentración utilizada en esta Tesis), se obtuvo una concentración estimada de 2×10^7 UFC/ml para ambos microorganismos, mientras que con el medio base (sin suplementar) la concentración encontrada estuvo por debajo de 10^7 UFC/ml. De acuerdo a Kulozik & Wilde (1999), niveles crecientes de extracto de levadura (rango: 0 - 2,5 % p/v) en el desarrollo de *L. helveticus* en permeado de suero influyen significativamente en la obtención de biomasa, con un aumento exponencial de este parámetro (hasta alcanzar 10 veces su valor inicial) respecto al medio base (sin suplementar) y, adicionalmente, observó un aumento en la producción de ácido láctico. Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo son de utilidad para conocer las características de crecimiento de los aislados con el objetivo de una futura producción a gran escala, teniendo la alternativa de emplear un medio formulado más económico que el medio MRS tradicional.

1.3.6 Caracterización fenotípica de acuerdo al perfil de fermentación de azúcares

El género *Lactobacillus* incluye más de 200 especies (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1578>), las cuales se pueden clasificar de acuerdo a sus propiedades fisiológicas (Bernardeau et al., 2008; Ganzle & Follador, 2012; Lukjancenko et al., 2012).

La identificación taxonómica a través del kit API es extensamente utilizada debido a que es de uso práctico y simple para la identificación de bacterias. En este caso, el kit API 50 CH (bioMérieux®, Francia) fue utilizado para complementar la identificación a nivel molecular realizada anteriormente (**Sección 1.3.3**), a través de la capacidad de los aislados de crecer utilizando 49 azúcares diferentes como fuente de carbono (Herbel et al., 2013); para el caso de los aislados *L. reuteri* / *vaginalis* 1239Y y 12310Y, se evaluó si era posible la diferenciación de acuerdo al patrón de fermentación de azúcares. Adicionalmente, se incluyeron los aislados de *L. salivarius* (cuya identificación había sido comprobada mediante la secuenciación de la región 16s del ARNr) y la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114 como control positivo para esta metodología.

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

Se confeccionó una tabla con datos extraídos de bibliografía sobre los perfiles de fermentación de cepas de referencia de las especies *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. vaginalis* y *L. plantarum* (Embley et al., 1989; Manual Sistemático Bacteriológico Bergey, 1994; tabla de identificación bioMérieux®, 2007)

Los resultados de la caracterización fenotípica de acuerdo al perfil de fermentación de azúcares de los aislados mencionados y la cepa control *L. plantarum* CIDCA 83114, se presentan en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Perfiles de fermentación de azúcares de los aislados *L. salivarius* 1231B (aislado 1231B), *L. salivarius* 1232Y (aislado 1232Y), *L. salivarius* 1233C (aislado 1233C), *L. salivarius* 1234C (aislado 1234C), *L. reuteri* / *vaginalis* 1239Y (aislado 1239Y), *L. reuteri* / *vaginalis* 12310Y (aislado 12310Y) y la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114 (Lp 83114) de acuerdo al kit API 50 CH.

Tubo	Azúcar	Aislado 1231B	Aislado 1232Y	Aislado 1233C	Aislado 1234C	Aislado 1239Y	Aislado 12310Y	Lp 83114
0	TESTIGO	-	-	-	-	-	-	-
1	GLYcerol	-	-	-	-	-	-	-
2	ERItrol	-	-	-	-	-	-	-
3	D-ARAbinosa	-	-	-	-	-	-	-
4	L-ARAbinosa	-	-	-	-	-	-	+
5	D-RIBosa	-	-	-	-	-	-	+
6	D-XILosa	-	-	-	-	-	-	-
7	L-XILosa	-	-	-	-	-	-	-
8	D-ADOnitol	-	-	-	-	-	-	-
9	Metil-βD-Xilopiranosida	-	-	-	-	-	-	-
10	D-GALactosa	+	+	+	+	+	+	+
11	D-GLUcosa	+	+	+	+	+	+	+
12	D-FRUctosa	+	+	+	+	+	+	+
13	D-MamNosa	+	+	+	+	-	+	+
14	L-SorBosa	-	-	-	-	-	-	-
15	L-Rhamnosa	-	-	-	-	-	-	-
16	DULcitol	-	-	-	-	-	-	-
17	INOsitol	-	-	-	-	-	-	-
18	D-MANitol	+	+	+	+	-	+	+
19	D-SORbitol	-	-	-	-	-	-	+
20	Metil- αD-Manopiranosida	-	-	-	-	-	-	-
21	Metil- αD-Glucopiranosida	-	-	-	-	-	-	-
22	N-AcetilGlucosamina	+	+	+	+	-	-	+
23	AMYgdalina	-	-	-	-	-	-	+
24	ARButina	-	-	-	-	-	-	+
25	ESCulina citrato férrico	-	-	-	-	Marrón	-	Marrón
26	SALicina	-	-	-	-	-	-	+
27	D-CELobiosa	-	-	-	-	-	-	+
28	D-MALtosa	+	+	+	-	+	-	+
29	D-LACtosa (bovino)	+	+	+	+	+	+	+
30	D-MELibiosa	+	+	+	+	+	+	+
31	D-SACarosa	+	+	+	+	+	+	+
32	D-TREhalosa	-	-	-	-	-	-	+
33	INUlina	-	-	-	-	-	-	-
34	D-MeLeZitosa	-	-	-	-	-	-	+
35	D-RAFinosa	+	+	+	+	+	+	+
36	AlMiDón	-	-	-	-	-	-	-

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

37	GLYcóGeno	-	-	-	-	-	-	-
38	XiLiToI	-	-	-	-	-	-	-
39	GENTibiosa	-	-	-	-	-	-	-
40	D-TURanosa	-	-	-	-	-	-	-
41	D-LIXosa	-	-	-	-	-	-	-
42	D-TAGatosa	-	-	-	-	-	-	-
43	D-FUCosa	-	-	-	-	-	-	-
44	L-FUCosa	-	-	-	-	-	-	-
45	D-ARabitoL	-	-	-	-	-	+	-
46	L-ARabitoL	-	-	-	-	-	-	-
47	GlucNaTo potásico	-	-	-	-	-	-	-
48	2-CetoGluconato potásico	-	-	-	-	-	-	-
49	5-CetoGluconato potásico	-	-	-	-	-	-	-

Los aislados del género *Lactobacillus* mostraron perfiles de utilización de azúcares similares entre ellos: los perfiles de *L. salivarius* resultaron idénticos (con excepción de la fosa 28, D-maltosa, cuyo resultado fue (+) para *L. salivarius* 1234C, pero (-) para los demás aislados) y se diferenciaron de los perfiles de fermentación de los aislados *L. reuteri* / *vaginalis* 1239Y y 12310Y.

Dentro de una misma especie, las cepas de *Lactobacillus* mostraron perfiles de fermentación de azúcares muy similares, donde para el caso *L. salivarius* 1231B, 1232Y y 1234C, los perfiles sólo variaron en 1 azúcar (D-maltosa). Este resultado coincide con el obtenido por Kobierecka et al. (2017), donde se analizaron los perfiles de fermentación de distintas cepas de *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. agilis*. Por otro lado, al comparar los perfiles de la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114 con los aislados de *L. reuteri* / *vaginalis*, se encontraron variaciones de hasta 11 azúcares en un total de 49, siendo *L. plantarum* CIDCA 83114 la cepa evaluada en esta Tesis con capacidad de fermentar el mayor número de azúcares.

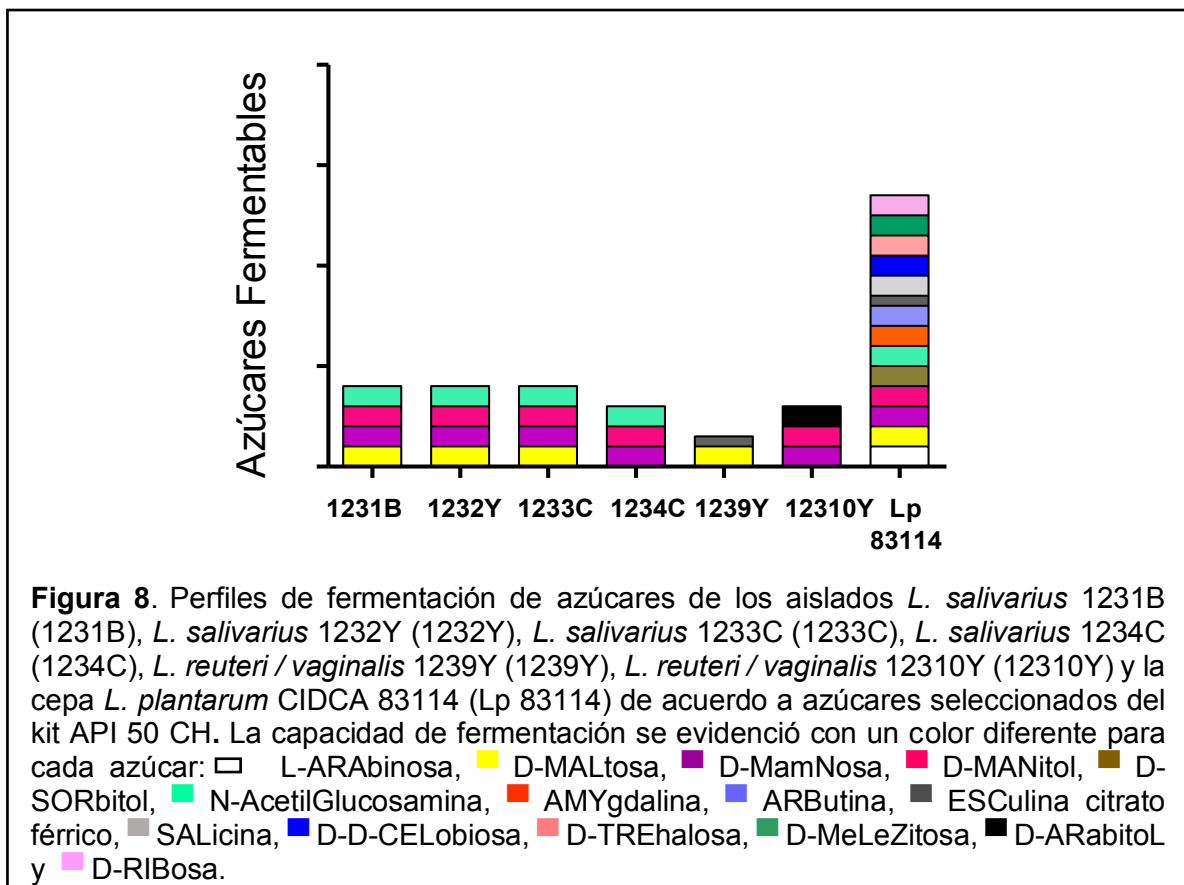
De acuerdo a los resultados obtenidos y los datos hallados en bibliografía (Roissart & Luquet, 1994; tabla API 50CHL Medium), se determinó que *L. salivarius* 1231B, *L. salivarius* 1232Y y *L. salivarius* 1233C alcanzaron un 92 % de similitud con una cepa *L. salivarius*, mientras que *L. salivarius* 1234C obtuvo un 90 % de similitud con una cepa *L. salivarius*.

Para *L. reuteri* / *vaginalis* 1239Y se observaron porcentajes de similitud respecto a *L. reuteri* y a *L. vaginalis* de 94 % y 96 %, respectivamente. Para *L. reuteri* / *vaginalis* 12310Y, se obtuvo porcentajes de similitud respecto a *L. reuteri* y *L. vaginalis* de 88 % y 94 %, respectivamente. Aunque de acuerdo a los porcentajes de similitud, ambos aislados serían identificados como *L. vaginalis*, se observó que los perfiles de fermentación de azúcares son diferentes (**Figura 8**). Por lo que sería indispensable para

poder identificar a estos aislados utilizar una técnica molecular con primers específicos de cada especie.

Ninguna de las bacterias evaluadas fue capaz de fermentar los siguientes veintisiete azúcares: glicerol, eritritol, D-arabinosa, D-xilosa, L-xilosa, L-rhamnosa, D-adonitol, Metil-βD-xilopiranosida, L-sorbosa, dulcitol, inositol, metil- αD-manopiranosida, metil-αD-glucopiranosida, inulina, almidón, glicógeno, xilitol, gentibiosa, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, L-arabitol, gluconato potásico, 2-cetogluconato potásico y 5-cetogluconato potásico.

Dentro de los 49 azúcares empleados en la prueba, la asimilación de siete de ellos (D-galactosa, D-glucosa, D-lactosa, D-melibiosa, D-rafinosa, D-fructosa y D-sacarosa) fue común para todas las especies de *Lactobacillus* spp evaluadas, mientras que para quince de ellos (amigdalina, arbutina, D-arabitol, D-celobiosa, D-manitol, D-manosa, D-melezitosa, D-ribosa, D-sorbitol, D-trehalosa, D-maltosa, esculina, L-arabinosa, N-acetilglucosamina, salicina) la fermentación fue dependiente de la especie (Kobierecka et al., 2017). Por lo que, para visualizar de forma simplificada las diferencias encontradas en la fermentación de estos quince azúcares, se presenta la siguiente figura (Figura 8).



Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

En conclusión, las identidades taxonómicas obtenidas a partir del perfil de fermentación de azúcares coinciden con las obtenidas a partir de técnicas moleculares para los aislados de *L. salivarius* (1231B, 1232Y, 1233C y 1234C). Para los aislados de *L. reuteri* / *vaginalis* 1239Y y 12310Y es necesario realizar la identificación molecular con primers especie-específicos.

La capacidad de cada aislado de poder fermentar y metabolizar diferentes fuentes de carbono es característica de cada especie dentro del mismo género.

Como resultado final del presente capítulo y a modo de resumen, se presenta en la Tabla 11 el nombre final de cada aislado, órgano de origen, condición de aislamiento e identificación molecular.

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

Tabla 11. Nombre final del aislado, órgano de origen, condición de aislamiento e identificación molecular.

Aislado	Nombre final	Órgano de origen	Condición de aislamiento	Identificación molecular
B1	<i>L. salivarius</i> CM-CIDCA 1231B	Buche	MRS en aerobiosis	<i>L. salivarius</i>
Y1	<i>L. salivarius</i> CM-CIDCA 1232Y	Yeyuno	MRS en aerobiosis	<i>L. salivarius</i>
C2	<i>L. salivarius</i> CM-CIDCA 1233C	Ciego	MRS en aerobiosis	<i>L. salivarius</i>
C5	<i>L. salivarius</i> CM-CIDCA 1234C	Ciego	MRS en aerobiosis	<i>L. salivarius</i>
C9	<i>L. agilis</i> CM-CIDCA 1235C	Ciego	MRS en aerobiosis	<i>L. agilis</i>
B7	<i>L. johnsonii</i> CM-CIDCA 1236B	Buche	MRS en aerobiosis	<i>L. johnsonii</i>
Y9	<i>L. johnsonii</i> CM-CIDCA 1237Y	Yeyuno	MRS en aerobiosis	<i>L. johnsonii</i>
C10	<i>L. salivarius</i> CM-CIDCA 1238C	Ciego	MRS en aerobiosis	<i>L. salivarius</i>
Y11	<i>L. reuteri / vaginalis</i> CM-CIDCA 1239Y	Yeyuno	MRS en anaerobiosis	<i>L. reuteri / L. vaginalis</i>
Y12	<i>L. reuteri / vaginalis</i> CM-CIDCA 12310Y	Yeyuno	MRS en anaerobiosis	<i>L. reuteri / L. vaginalis</i>
Coco 1	<i>Enterococcus</i> sp. 1	Ciego	MRS +NaCl (6,5 % p/v) en aerobiosis	<i>Enterococcus hirae / E. faecium / E. durans</i>
Coco 2	<i>Enterococcus</i> sp. 2	Ciego	SF en aerobiosis	<i>Enterococcus hirae / E. faecium / E. durans</i>
Coco 3	<i>Enterococcus</i> sp. 3	Yeyuno	SF en aerobiosis	<i>Enterococcus hirae / E. faecium / E. durans</i>

En los siguientes capítulos, se avanzó en el estudio de estos aislados para su potencial aplicación en la producción aviar teniendo en cuenta dos aspectos fundamentales, su capacidad antimicrobiana frente a *Salmonella* y su inocuidad al ser administradas en el agua de bebida de las aves.

1.4 Conclusiones

A partir de buche, yeyuno-íleon y ciegos, órganos del tracto gastrointestinal (TGI) de pollos broiler de diferentes edades, se aislaron sesenta y dos bacterias, presuntamente del grupo de bacterias lácticas. Del total de aislados, mediante el estudio de resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal *in vitro*, se seleccionaron diez lactobacilos y tres cocos como potenciales cepas probióticas. La identificación a nivel molecular arrojó que cinco aislados pertenecían a la especie *L. salivarius*, dos a la especie *L. johnsonii*, dos a las especies *L. reuteri*/*L. vaginalis* y uno a la especie *L. agilis*. Mientras que los cocos fueron identificados, parcialmente, dentro del género *Enterococcus* sp., donde las especies posibles fueron *Enterococcus hirae* / *E. faecium* / *E. durans*. Resta realizar la identificación de estos tres aislados, utilizando primers específicos de acuerdo a las posibles especies.

A lo largo de este capítulo, se evaluaron otras características probióticas, como la capacidad de adhesión al epitelio intestinal, donde no se encontraron diferencias significativas entre los aislados evaluados. También se estudió la capacidad de crecer en medios de cultivo alternativos al medio de crecimiento tradicional comercial (MRS), tales como los medios formulados con diferentes componentes (medio A y medio C); con permeado de suero y permeado de suero suplementado con extracto de levadura; donde los aislados fueron capaces de crecer y acidificar el medio de cultivo y, en algunos casos, alcanzando valores de pH y concentración comparables a los obtenidos en el medio MRS. Por lo que todos estos medios podrían considerarse una opción viable para el desarrollo y obtención de biomasa a partir de los aislados.

Adicionalmente, fue posible su identificación taxonómica a través del perfil de fermentación de azúcares.

Se debe destacar que el trabajo continuó con un número reducido de aislados (diez) para profundizar el estudio de sus propiedades probióticas. Sin embargo, la totalidad de los mismos se conservan en el cepario de la Cátedra de Microbiología, a -80 °C, a la espera de ser evaluados en un futuro

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización probiótica e identificación de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

CAPÍTULO 2

Actividad antimicrobiana de
Lactobacillus y *Enterococcus*
seleccionados sobre *Salmonella*
in vitro

2.1 Objetivos

- Evaluar la capacidad de inhibir el crecimiento de *Salmonella enterica in vitro* de los cultivos completos, la fracción microbiana y los sobrenadantes libres de células (SLC) obtenidos a partir del cultivo de los aislados de *Lactobacillus* y *Enterococcus*.
- Establecer la relevancia de la acidez y los ácidos orgánicos en dicha inhibición.
- Estudiar la interacción de *Salmonella enterica* con el epitelio intestinal en cultivo en presencia de los aislados de *Lactobacillus*.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Se utilizaron los lactobacilos, *L. salivarius* CM-CIDCA 1231B, *L. salivarius* CM-CIDCA 1232Y, *L. salivarius* CM-CIDCA 1233C, *L. salivarius* CM-CIDCA 1234C, *L. agilis* CM-CIDCA 1235C, *L. johnsonii* CM-CIDCA 1236B, *L. johnsonii* CM-CIDCA 1237Y, *L. salivarius* CM-CIDCA 1238C, *L. reuteri* / *vaginalis* CM-CIDCA 1239Y y *L. reuteri* / *vaginalis* CM-CIDCA 12310Y, aislados a partir del tracto gastrointestinal de pollos y caracterizados en el **Capítulo 1**.

También se utilizaron dos cepas aisladas de kefir: *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 y *L. kefir* CIDCA 8321. Las cepas se cultivaron en caldo MRS (De Man- Rogosa- Sharpe, Biokar Diagnostics, Beauvais, France) a 37 °C durante 24 horas. Para el crecimiento de *L. kefir* CIDCA 8321, se utilizó caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharp, Difco, Detroit, USA). Para los ensayos donde se utilizaron los sobrenadantes libres de células, los mismos se obtuvieron a partir del cultivo de los lactobacilos, los cuales fueron centrifugados a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de celulosa con un diámetro de poro de 0,22 µm (Millipore Corporation, Milford, USA). El pH se determinó con un microelectrodo combinado de vidrio (Cole-Parmer, Illinois, USA).

Para realizar los ensayos de inhibición de *Salmonella*, se utilizaron las cepas *Salmonella enterica* serovar Enteritidis 105 y *S. enterica* serovar Gallinarum 111. La elección de las cepas se basó en los estudios realizados por Merino (2019). Adicionalmente, para determinar el porcentaje de reducción del crecimiento frente al SLC de *Enterococcus* sp. 2, se utilizaron las cepas *S. Enteritidis* 101 y *S. Enteritidis* 106. *S. Enteritidis* 101 es una cepa de origen humano y fue recibida por parte del Dr. Horacio Lopardo (HATL), *S. Enteritidis* 105 y 106 son cepas de origen aviar, recibidas del Dr. Gerardo Leotta (Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP-CONICET); mientras que *S. Gallinarum* 111 es una cepa de origen aviar aislada por investigadores de la Estación Experimental Agrícola INTA Concepción del Uruguay. Todas las cepas están conservadas en medio Luria Bertani (LB, ver formulación en **Apéndice 1**) adicionado de glicerol al 15% v/v a -80 °C. A partir de este stock, se realizó un repique de la cepa en medio de cultivo LB y se incubó a 37 °C durante 18 horas. El mismo se conservó en la heladera como cultivo de trabajo. Para los ensayos, se realizaron repiques en medio LB fresco a partir del cultivo de trabajo. Los recuentos microbianos se realizaron en agar Hektoen Entérico HE (Britania, Buenos Aires, Argentina). La morfología típica de la colonia en este medio

es color verde azulada (no hay viraje del indicador ya que no fermentan la lactosa), con centro negro (productoras de H₂S).

Para algunos ensayos se utilizó un aislado de *Escherichia coli* que se obtuvo a partir de muestras de tejidos y fluidos de pollos enfermos (ronroneo, decaimiento y ojos llorosos, entre otros síntomas) de una granja avícola ubicada en la provincia de Buenos Aires. Su identidad fue previamente determinada por crecimiento en medios selectivos y diferenciales. Fue realizado un antibiograma, demostrando resistencia a los antibióticos Trimethoprim sulfa, ampicilina, cafalosporina de primera y moderada resistencia a norfloxacina; siendo sensible a aminopenicilina, sulbactama y nitrofuranos. El aislado fue cultivado en caldo nutritivo (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) a 37 °C durante 18 horas.

La pureza de los cultivos microbianos se verificó mediante observación microscópica de preparados, fijados y teñidos mediante la técnica descrita por Gram (Gram, 1884) y los medios de cultivo utilizados fueron esterilizados por calor húmedo, en autoclave, a 1 atmósfera de sobrepresión durante 15 minutos.

2.2.2 Línea celular

Para los ensayos de asociación e invasión de *Salmonella* se utilizó la línea celular humana Caco-2/TC-7 (pasaje 23 a 30). La composición de los medios de cultivo utilizados para el cultivo de las células se detalla en el **Apéndice 1**. El manejo de la línea celular fue explicado en la **Sección 1.2.6.1**, perteneciente al **Capítulo 1**.

2.2.3 Estudio de los cultivos completos y los SLC de los aislados de *Lactobacillus* frente a *Salmonella enterica* in vitro

Se evaluó la capacidad de los lactobacilos de inhibir el desarrollo de *S. Enteritidis* 105 en medio MRS líquido a 37 °C durante 24 horas. Se trabajó con el cultivo completo, los microorganismos y el sobrenadante (SLC).

Se realizaron cinco tratamientos (Tto) denominados Tto A, Tto B, Tto C, Tto D y Tto E, además del control positivo (K). La composición de cada uno se detalla a continuación:

Tto A: *Salmonella*+ cultivo completo (microorganismos+ SLC)

Tto B: *Salmonella*+ SLC

Tto C: *Salmonella*+ microorganismos

Tto D: *Salmonella* + medio de cultivo acidificado artificialmente

Tto E: *Salmonella*+ SLC neutralizado (pH 7)

Control (K): *Salmonella*+ medio de cultivo sin fermentar

El cultivo de lactobacilo en medio MRS (incubado a 37 °C durante 24 horas) se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Al pellet se le realizó un doble lavado con solución salina (NaCl 0,9 % p/v) estéril, se centrifugó y se inoculó en el tubo correspondiente al Tto C, el cual contenía MRS fresco. A partir del sobrenadante, se obtuvo el SLC de acuerdo a lo detallado en la **Sección 2.2.1**, el cual se adicionó al tubo correspondiente al Tto B.

El Tto A se preparó utilizando el cultivo microbiano completo, es decir, los microorganismos más el producto de la fermentación (SLC).

El Tto D se preparó acidificando el medio MRS de manera artificial, utilizando ácido láctico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). El valor de pH simulado fue el mismo que se alcanzó al inocular el medio con el lactobacilo.

Para preparar el Tto E, el SLC se neutralizó con NaOH 1N.

Todos los tratamientos fueron inoculados con un cultivo en medio líquido de *S. Enteritidis* 105.

La incubación se realizó a 37 °C durante 24 horas. Se tomaron alícuotas de los tratamientos a diferentes períodos de tiempo para determinar la concentración de *Salmonella* viable. Se hicieron diluciones seriadas y recuentos en placas con agar Hektoen Entérico, incubándose a 37°C durante 24 horas.

2.2.4 Actividad inhibitoria de los sobrenadantes libres de células (SLC) de los aislados: porcentaje de reducción del crecimiento

Se estudió la capacidad de inhibición del crecimiento de diferentes aislados de *Salmonella* y *Escherichia coli* en presencia de los sobrenadantes libres de células (SLC) obtenidos a partir del crecimiento de los aislados. El ensayo se realizó en placas estériles de microdilución de 96 fosas (Brand®, Wertheim, Alemania), siguiendo la técnica de reducción de la germinación de conidios modificada (Gerez et al., 2009; Lavermicocca et al., 2000).

Se adicionaron 10 µl de una suspensión del patógeno (10^6 UFC/ml) en solución salina estéril y 90 µl del SLC obtenido de acuerdo a lo indicado en la **Sección 2.2.1** a cada fosa de la microplaca. El efecto del SLC se evaluó sin diluir (en concentración directa) y diluido a cuatro concentraciones diferentes. Las placas se incubaron en estufa a 37 °C por 24 horas. El control positivo del ensayo consistió en el SLC del medio de cultivo sin fermentar, centrifugado y esterilizado por microfiltración (al igual que los SLC

fermentados) e inoculado con la suspensión del patógeno; y el control negativo consistió en SLC fermentado e inoculado con solución salina estéril (en lugar de la suspensión del patógeno). La esterilidad de los SLC se confirmó tomando una alícuota con un ansa y realizando estrías en agar MRS. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Los resultados se obtuvieron a partir de la lectura de la absorbancia a longitud de onda de 620 nm, utilizando un lector de microplacas Infinite F50 (Tecan Trading AG, Suiza). La actividad inhibitoria se expresó como el porcentaje de reducción del crecimiento (% RC) en relación al control positivo (**Ecuación 1**):

$$\% \text{ RC} = [(DOc^+ - DOto) / DOc^+] \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

donde: DOc⁺: Densidad óptica del control positivo a 620 nm

DOto: Densidad óptica del tratamiento a 620 nm

De acuerdo al porcentaje de inhibición, la reducción del crecimiento se informó como positiva (mayor al 20 %), baja (entre 20 y 40 %), media (entre el 40 % y 70 %) y fuerte (mayor al 70 %) (Gerez et al., 2009; Gamba et al., 2016).

Los ensayos fueron realizados por cuadruplicado.

Adicionalmente, se evaluó si el efecto inhibitorio fue de carácter bactericida o bacteriostático, es decir, si había tenido lugar muerte bacteriana o si la inhibición sólo tenía lugar en presencia del SLC. Se tomó una alícuota de las fosas sin crecimiento a simple vista (ausencia de turbidez) con un ansa y se sembró en agar Hektoen Entérico (para *Salmonella*) o en agar nutritivo (para *E. coli*). Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Algunos SLC se almacenaron a -20 °C para determinar la concentración de ácidos orgánicos mediante HPLC (**Sección 2.3.3**).

2.2.5 Determinación de la composición de ácidos orgánicos débiles en los sobrenadantes libres de células de los aislados

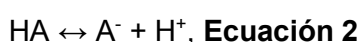
Se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la presencia de ácidos orgánicos en los sobrenadantes libre de células (SLC), obtenidos de acuerdo a lo expresado en la **Sección 2.2.1**. Se realizó una dilución 1/5 en agua bidestilada de las muestras y de los medios de cultivo sin inocular (como control) a fin de garantizar que la concentración de ácidos se encuentre dentro del rango de la curva patrón. De cada muestra, se inyectó en el cromatógrafo un volumen de 10 µl, a una velocidad de flujo de

0,7 ml/minuto a 60 °C, utilizando H₂SO₄ 0,009 N como fase móvil. Los solventes fueron desgaseados previamente bajo vacío. La separación de los ácidos se realizó utilizando una columna de intercambio iónico AMINEX HPX- 87H (Biorad Labs) equipada con un detector UV a 214 nm (Waters TM 996, Millipore Corporation, Milford, MA 01757, USA). La identificación de cada ácido orgánico se basó en la comparación de los tiempos de retención de las muestras en la columna con soluciones estándar conformadas por diferentes concentraciones de ácido láctico, ácido acético y ácido propiónico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) preparadas de acuerdo a lo presentado en la **Sección 1 del Apéndice 2**. Tanto las soluciones estándar como las muestras fueron previamente filtradas a través de una membrana de celulosa con un diámetro de poro de 0,22 µm (Millipore Corporation, Milford, USA). El pH se determinó con un microelectrodo combinado de vidrio (Cole-Parmer, Illinois, USA). Los cromatogramas y datos obtenidos fueron procesados utilizando los programas Microsoft® Excel® 2010 (Microsoft Office Professional Plus 2010) y Peak Fit Software V4.12 (SeaSolve Software Inc., India).

2.2.5.1 Determinación de la concentración de ácidos orgánicos no disociados

A partir de las concentraciones de ácidos orgánicos determinadas por HPLC, se calculó la concentración de ácidos no disociados ya que ha sido demostrado que la acción inhibitoria y antimicrobiana es proporcional a la concentración de la fracción no disociada (Garrote et al., 2000; León Peláez et al., 2006; Gamba, 2015).

Para el cálculo de la concentración de un ácido orgánico no disociado ([LH]) se tuvo en cuenta que la reacción de disociación es,



donde la constante de equilibrio (Ka) está determinada por:

$$K_a = \frac{[\text{A}^-] \times [\text{H}^+]}{[\text{HA}]}, \text{ Ecuación 3}$$

La concentración de ácido orgánico total (Ca) está dada por la suma del ácido disociado ([A⁻]) y el no disociado ([HA]):

$$C_a = [\text{HA}] + [\text{A}^-], \text{ Ecuación 4}$$

Por lo que, a partir de lo anterior, la Ka se puede expresar como:

$$K_a = \frac{((C_a - [\text{LH}]) \times [\text{H}^+])}{[\text{LH}]}, \text{ Ecuación 5}$$

Reordenando la **Ecuación 5**, el cálculo de la concentración de ácido orgánico no disociado se realizó de la siguiente manera:

$$HA = \frac{Ca \times [H^+]}{([H^+] + Ka)}, \text{ Ecuación 6}$$

Esta ecuación se utilizó para determinar las concentraciones de ácido láctico, acético y propiónico no disociados, de acuerdo a los valores de las constantes de disociación a 25 °C (pKa láctico: 3,79; pKa acético: 4,75, pKa propiónico: 4,88) (Skoog, 2015).

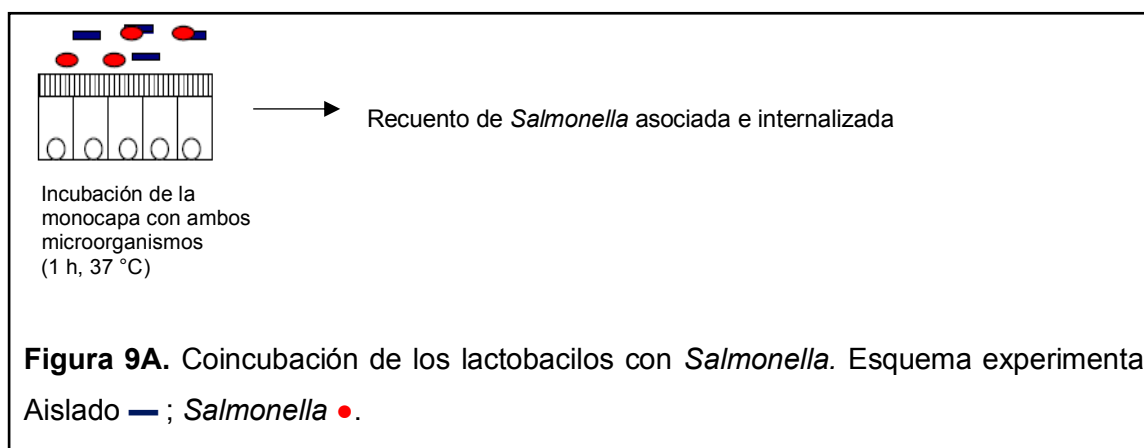
2.2.6 Efecto de los lactobacilos sobre la asociación e invasión de *Salmonella* a células Caco-2/TC-7

Se evaluó el efecto de la presencia de los lactobacilos en la capacidad de *Salmonella* de asociarse e invadir células humanas del epitelio intestinal *in vitro*.

De acuerdo a Golowczyc (2008), se utilizó gentamicina (en concentración 100 µg/ml PBS estéril) para diferenciar las bacterias de *Salmonella* asociadas de las internalizadas. Este antibiótico no difunde a través del dominio apical de las células, por lo que las bacterias que no se internalizan son afectadas por el antibiótico y las internalizadas, sobreviven. Se realizaron dos tipos de ensayos:

a. *Coincubación entre el patógeno y los lactobacilos*

Se utilizaron placas de 24 fosas con células Caco2/TC-7. Las fosas se lavaron 2 veces con PBS estéril para eliminar el medio de cultivo. Se preparó la suspensión de cada lactobacilo a partir de un cultivo en fase estacionaria, la cual se centrifugó (10.000 rpm por 10 minutos), se realizaron dos lavados con PBS estéril y se suspendió en el medio de cultivo DMEM de adhesión (composición en **Apéndice 2**). Se adicionaron 0,25 ml de suspensión de *Salmonella* (de concentración 1×10^8 UFC/ml) y 0,25 ml de la suspensión del lactobacilo (de concentración 1×10^8 UFC/ml) a cada fosa. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C en atmósfera controlada (5% CO₂ – 95% aire), sin agitación, y se determinó el número de bacterias asociadas e internalizadas, como se explicará a continuación (**Figura 9A**).

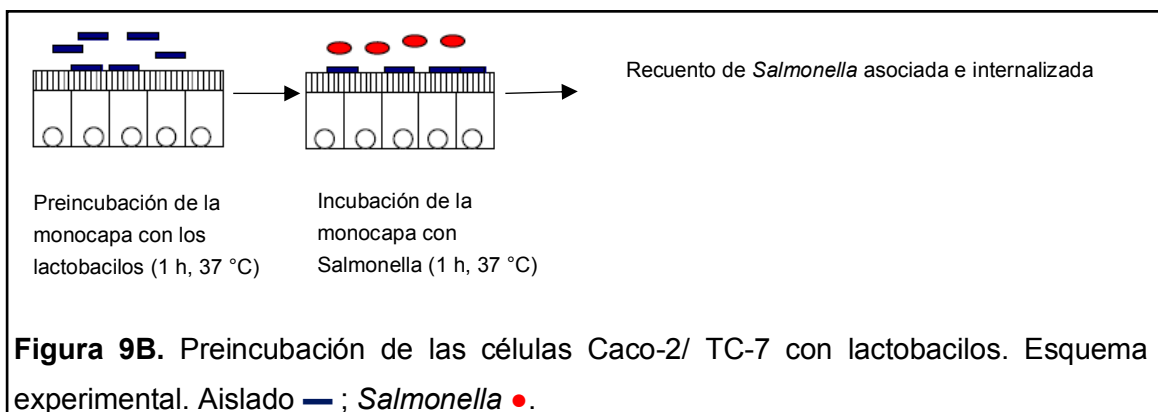


Se realizó un control de la asociación e invasión de *Salmonella*. Para esto, cuatro fosas (dos para evaluar asociación y dos para evaluar invasión) fueron preincubadas con DMEM de adhesión sin lactobacilos junto a la suspensión de *Salmonella*.

b. Preincubación de las células con los lactobacilos

Se utilizaron placas de 24 fosas con células Caco2/TC-7. Las fosas se lavaron 2 veces con PBS estéril para eliminar el medio de cultivo. Se preparó la suspensión de cada lactobacilo a partir de una alícuota de un cultivo en fase estacionaria, la cual se centrifugó (10.000 rpm por 10 minutos), se realizaron dos lavados con PBS estéril y se suspendió en el medio de cultivo celular DMEM de adhesión (composición en **Apéndice 2**). Se adicionaron 0,5 ml por fosa de la suspensión del lactobacilo (de concentración 1×10^8 UFC/ml) y las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C en atmósfera controlada (5 % CO₂ - 95 % aire), sin agitación. Se realizaron tres lavados con PBS estéril para eliminar las bacterias no asociadas. Seguidamente, se adicionaron 0,5 ml de una suspensión de *Salmonella* en DMEM de adhesión (de concentración 1×10^8 UFC/ml) en cada fosa y se incubaron durante 1 hora a 37 °C en atmósfera controlada (5 % CO₂ -95 % aire), sin agitación. Se realizaron tres lavados sucesivos con PBS estéril para eliminar las bacterias no asociadas; luego, se cuantificó la concentración de *Salmonella* asociada e internalizada de acuerdo a lo explicado a continuación (**Figura 9B**).

Como control del ensayo, se agregó a las fosas 1 ml de DMEM de adhesión (sin lactobacilos) durante 1 hora a 37 °C y pasado ese tiempo, se adicionó la suspensión de *Salmonella* a cada fosa correspondiente y se continuó con el protocolo.



Los resultados se expresaron, a partir de la suma de tres experimentos independientes, de dos maneras diferentes: de acuerdo a la concentración de *Salmonella* por fosa (UFC/fosa) y utilizando las ecuaciones para asociación relativa e invasión relativa de *Salmonella*:

A fin de cuantificar la asociación de bacterias (adheridas + internalizadas), se adicionaron 0,5 ml de agua bidestilada estéril por fosa y la placa fue incubada durante 1 hora a 37 °C para permitir el desprendimiento de la monocapa. Luego, se tomó todo el volumen de la fosa y se realizaron diluciones seriadas con triptona estéril al 0,1 % p/v. Se determinó la concentración de *Salmonella* asociada (tanto la adherida a la superficie celular como la que logró internalizarse en la célula) por recuento en agar LB. La asociación relativa de *Salmonella* se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Asociación relativa de } \mathbf{Salmonella} = \left[\frac{\text{Concentración de } \mathbf{Salmonella} \text{ en presencia del lactobacilo}}{\text{Concentración de } \mathbf{Salmonella} \text{ en fosa control}} \right] \times 100 \quad \mathbf{Ecuación 7}$$

Para cuantificar la invasión, se adicionaron 0,5 ml de gentamicina (Parafarm Droguería Saporiti S.A.C.I.F.I.A., Buenos Aires, Argentina) de concentración 100 µg/ml PBS estéril por fosa y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Pasado ese tiempo, se realizaron dos lavados con PBS estéril para eliminar el antibiótico y se adicionaron 0,5 ml de agua bidestilada estéril durante 1 hora a 37°C para lisar la monocapa y permitir que las bacterias internalizadas se liberen durante la incubación . Por último, se realizaron diluciones seriadas con triptona estéril al 0,1 % p/v y se determinó la concentración de *Salmonella* internalizada en las células por recuento en agar LB. La invasión relativa de *Salmonella* se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Invasión relativa de } \mathbf{Salmonella} = \left[\frac{\text{Concentración de } \mathbf{Salmonella} \text{ en presencia del lactobacilo}}{\text{Concentración de } \mathbf{Salmonella} \text{ en fosa control}} \right] \times 100 \quad \mathbf{Ecuación 8}$$

2.2.7 Efecto de los lactobacilos sobre la formación de biofilm de *Salmonella*

Se determinó el efecto de la presencia de los lactobacilos en el proceso de formación de biofilm de una cepa de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis* 105) según el protocolo de Castelijin et al. (2013), con algunas modificaciones. Para la cuantificación de los resultados, se utilizó la técnica de recuento en placa.

Los ensayos se realizaron en placas de poliestireno de 24 fosas. Se tomó una alícuota de un cultivo de cada lactobacilo y se separó la fracción microbiana del sobrenadante por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos. Los microorganismos fueron lavados con PBS estéril y se suspendieron en caldo LB hasta alcanzar una concentración de 1×10^8 UFC/ml (correspondiente a una DO_{550nm} de 0,2). En cada fosa, la concentración final de los lactobacilos fue la mencionada, mientras que la concentración de *Salmonella* inoculada fue 1×10^7 UFC/ml. Además, se realizó un control positivo, el cual consistió en la incubación de una alícuota del cultivo de *Salmonella*, sin el agregado de los lactobacilos, en las mismas condiciones ensayadas. La placa se incubó por 24 horas a 37 °C en estufa abierta a la atmósfera. Pasado el tiempo de incubación, se descartó el medio y se realizó un doble lavado con PBS estéril para eliminar las bacterias no adheridas. Luego, con ayuda de un scraper, se levantaron las bacterias que habían quedado adheridas a la fosa y se suspendieron en 1 ml de PBS estéril. Se realizaron diluciones seriadas en solución salina estéril y se sembraron por duplicado en placas de agar LB. Las placas se incubaron por 24 horas, a 37 °C para determinar la concentración microbiana (UFC/fosa).

2.2.8 Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos son el promedio de experimentos realizados por duplicado o triplicado. Se presentan como los valores medios y sus correspondientes desviaciones estándar. Todos los parámetros se analizaron con el programa estadístico GraphPadPrism versión 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California). Se consideraron diferencias significativas los valores de $p < 0,05$. Las diferencias significativas entre promedios se calcularon por ANOVA de uno o dos factores (según lo que se indique en cada ensayo), seguido de test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha = 0,05$).

2.3 Resultados y Discusión

2.3.1 Efecto de los cultivos completos y los SLC de los aislados de *Lactobacillus* frente a *Salmonella enterica* in vitro

La acción inhibitoria de los lactobacilos está mediada principalmente por la presencia en el medio de cultivo de compuestos antimicrobianos, incluidos los ácidos orgánicos y bacteriocinas, y por mecanismos de coagregación entre las bacterias patógenas y los lactobacilos (Coman et al., 2014). En esta sección se evaluó la capacidad de inhibición de los aislados de *Lactobacillus* (caracterizados en el **Capítulo 1**) frente al crecimiento de *S. enterica* serovar Enteritidis cepa 105, coincubando el patógeno con las distintas fracciones del medio de cultivo fermentado: el producto fermentado completo (incluye la fracción microbiana y el producto fermentado), la fracción microbiana y el sobrenadante libre de células (SLC, producto fermentado filtrado).

Se evaluó el efecto inhibitorio de *L. salivarius* 1231B, *L. salivarius* 1232Y, *L. salivarius* 1234C y *L. agilis* 1235C frente a *S. Enteritidis* 105 cuando ambos microorganismos se incubaban juntos (coincubación). La concentración de *S. Enteritidis* 105 se ajustó a la concentración de cada aislado.

Los tratamientos (Tto) evaluados se prepararon de acuerdo a lo expresado en la **Sección 2.2.3 (Materiales y Métodos)**. Aquí sólo se recuerda, resumidamente, la composición de los tratamientos.

Tto A: *Salmonella*+ cultivo completo (microorganismos+ SLC)

Tto B: *Salmonella*+ SLC

Tto C: *Salmonella*+ microorganismos (mo)

Tto D: *Salmonella* + medio de cultivo acidificado artificialmente

Tto E: *Salmonella*+ SLC neutralizado

Control (K): *Salmonella*+ medio de cultivo sin fermentar

La concentración microbiana de todos los lactobacilos a las 24 horas de incubación fue $5,0 \pm 2,1 \times 10^8$ UFC/ml y los valores de pH de los cultivos fueron 4,2, 4,2, 3,9 y 4,4 para *L. salivarius* 1232Y, *L. salivarius* 1231B, *L. salivarius* 1234C y *L. agilis* 1235C, respectivamente. El cultivo del inóculo inicial de *S. Enteritidis* 105 fue $5,4 \pm 0,5 \times 10^8$ UFC/ml

A partir de estos cultivos, se evaluó el efecto inhibitorio a distintos tiempos en coincubación a 37 °C durante 24 horas y los resultados obtenidos para cada aislado fueron expresados en las Figuras 10, 11, 12 y 13.

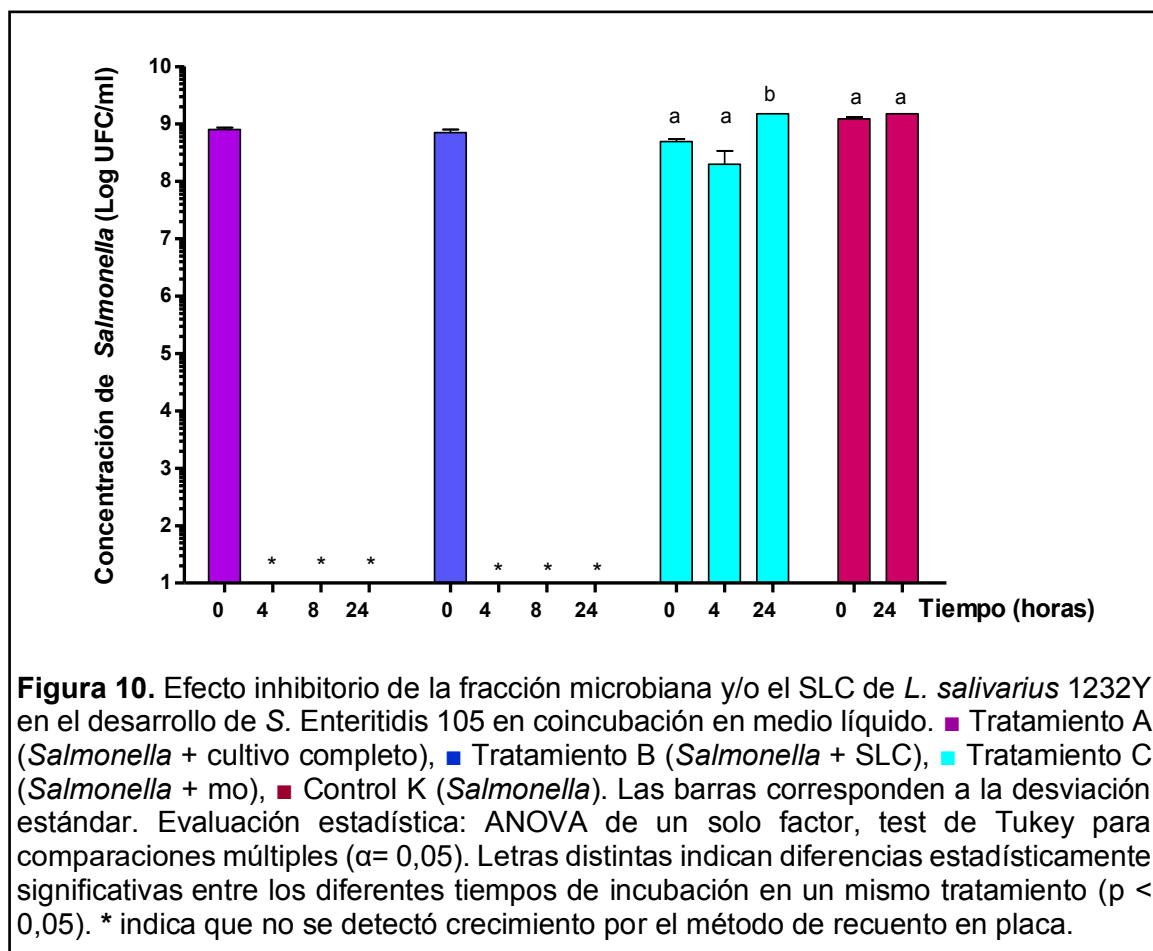


Figura 10. Efecto inhibitorio de la fracción microbiana y/o el SLC de *L. salivarius* 1232Y en el desarrollo de *S. Enteritidis* 105 en coincubación en medio líquido. ■ Tratamiento A (*Salmonella* + cultivo completo), ■ Tratamiento B (*Salmonella* + SLC), ■ Tratamiento C (*Salmonella* + mo), ■ Control K (*Salmonella*). Las barras corresponden a la desviación estándar. Evaluación estadística: ANOVA de un solo factor, test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha = 0,05$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de incubación en un mismo tratamiento ($p < 0,05$). * indica que no se detectó crecimiento por el método de recuento en placa.

De acuerdo a la Figura 10, tanto el cultivo completo como el SLC de *L. salivarius* 1232Y demostraron un marcado efecto inhibitorio frente al crecimiento de *S. Enteritidis* 105 entre las 0 y 4 horas de incubación a 37 °C, con un descenso en la concentración de siete órdenes logarítmicos. En cuanto a los microorganismos solos, se produjo un descenso en la concentración entre las 0 y 4 horas, pero no fue de carácter significativo; a las 24 horas, se alcanzó nuevamente un recuento igual al inicial. Esto podría deberse a que, entre las horas 4 y 24 de incubación, se activaron mecanismos de resistencia a las sustancias antimicrobianas presentes en el medio. Al comparar el tratamiento A y el tratamiento C, se comprobó que los microorganismos, por sí solos, no tienen efecto inhibitorio frente al desarrollo del patógeno. La presencia del SLC, en donde se encuentran los metabolitos producidos por los microorganismos, fue lo que causó el mayor efecto inhibitorio del patógeno.

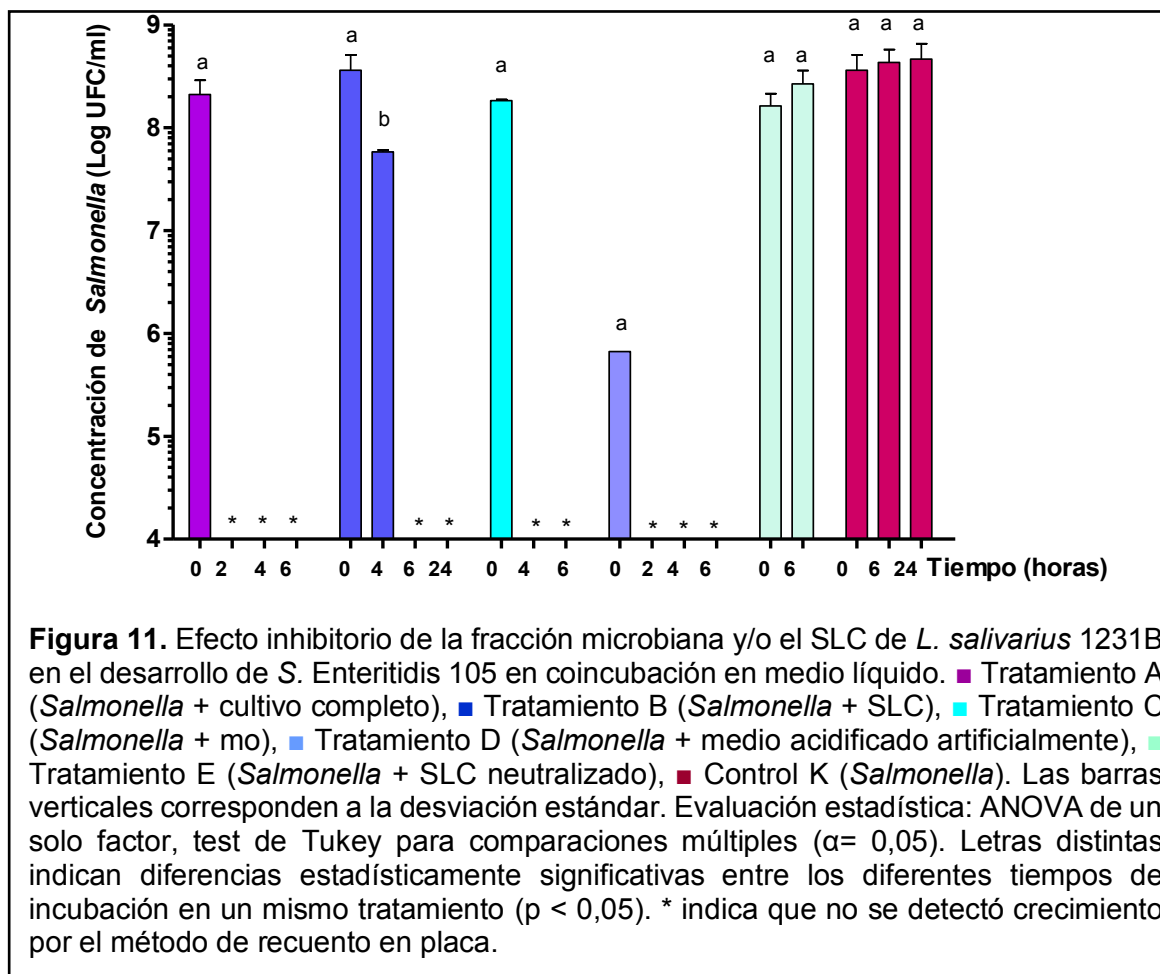
También se determinó la concentración del lactobacilo durante la coincubación a fin de conocer si se mantenía viable. Se realizaron recuentos en agar MRS a partir de los tratamientos que lo tenían en su formulación, es decir, en el tratamiento A y en el tratamiento C (Tabla 12).

Tabla 12. Concentración de *L. salivarius* 1232Y en el tratamiento A y tratamiento C, a diferentes tiempos durante la evaluación del efecto inhibitorio, en coincubación con *S. Enteritidis* 105 a 37°C. Evaluación estadística: ANOVA de un solo factor, test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha = 0,05$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de incubación dentro de un mismo tratamiento ($p < 0,05$).

Tiempo (horas)	Concentración \pm DE (UFC/ml)	
	Tratamiento A	Tratamiento C
0	^a $5,9 \pm 1,3 \times 10^8$	^{c,d} $9,5 \pm 0,7 \times 10^7$
4	^a $4,7 \pm 0,2 \times 10^8$	^c $2,0 \pm 0,7 \times 10^8$
8	^b $4,9 \pm 0,3 \times 10^7$	^e $6,2 \pm 0,3 \times 10^8$
24	^b $1,0 \pm 0,1 \times 10^7$	^d $1,2 \pm 4,6 \times 10^7$

En el tratamiento A, la viabilidad de *L. salivarius* 1232Y disminuyó de manera significativa a las 24 horas ($p < 0,05$), reduciéndose en un orden logarítmico. Respecto al tratamiento C, la concentración aumentó significativamente a las 8 horas y, al finalizar el tiempo de incubación, se mantuvo en el mismo orden que al comienzo del ensayo (Tabla 12). De esta manera, se verificó que el lactobacilo se mantuvo viable durante el ensayo.

Para el estudio del efecto inhibitorio de *L. salivarius* 1231B, se trabajó con tiempos de incubación más cortos (Figura 11).



Para la cepa *L. salivarius* 1231B, el cultivo completo demostró un fuerte efecto antimicrobiano, con un descenso en la concentración de ocho órdenes logarítmicos entre las 0 y 2 horas de incubación a 37 °C (tratamiento A). Para el caso del SLC (tratamiento B), se observó un descenso estadísticamente significativo de un orden de magnitud entre las horas 0 y 4, para luego descender hasta siete órdenes de magnitud a las 6 horas y mantenerse así hasta el tiempo final de incubación (24 horas). En presencia de la fracción microbiana (tratamiento C), se observó un descenso significativo de la concentración de *Salmonella* dentro de las primeras 4 horas de incubación a 37 °C, disminuyendo hasta ocho órdenes logarítmicos y manteniéndose constante hasta las 24 horas. En el caso del tratamiento D, el cual contenía el SLC acidificado artificialmente con ácido láctico, a tiempo cero, la concentración fue menor (1×10^6 UFC/ml) respecto a los demás tratamientos y, a las 2 horas de incubación, la concentración descendió hasta no ser detectada por el método de recuento en placa. En el tratamiento E, la neutralización del SLC fermentado no tuvo efecto antibacteriano, manteniendo su concentración en el mismo orden logarítmico. Se constató la viabilidad de *S. Enteritidis* 105 durante toda la incubación en el grupo Control K.

Al realizar la comparación entre el tratamiento A y el tratamiento B, se determinó que existe acción inhibitoria por parte de las bacterias, siendo mayor el efecto antibacteriano mediado por los metabolitos liberados al SLC y las bacterias vivas. Esto también se puede concluir al comparar con el tratamiento C, donde a las 4 horas de coincubación con el patógeno, disminuyó su concentración significativamente hasta no ser detectada por el método, mientras que en el tratamiento A se determinó una disminución significativa a las 2 horas de coincubación (2 horas antes).

En el tratamiento B, a las 6 horas de incubación, se observó que la concentración de *S. Enteritidis* 105 ya no fue detectada mientras que en el tratamiento E, se mantuvo en el orden de 10^8 UFC/ml. Al neutralizar el SLC, disminuyó la concentración de los ácidos orgánicos no disociados (**Ecuación 6, Sección 2.2.5.1**) disueltos en el medio de cultivo, por lo que el poder inhibitorio fue menor. Esto indica la importancia del efecto antimicrobiano ejercido por los ácidos orgánicos débiles presentes en el medio de cultivo fermentado por el aislado, sin despreciar el efecto producido por otros metabolitos.

A un mismo valor de pH, el producto acidificado artificialmente con un ácido orgánico débil, como es el ácido láctico, obtuvo mayor efecto inhibitorio que la suma de los ácidos orgánicos presentes en el SLC. A la hora cero de incubación (al ponerse en contacto inmediatamente con el patógeno), la concentración de *S. Enteritidis* 105 estuvo dos órdenes de magnitud por debajo en el tratamiento D, respecto al tratamiento B, y a las 2 horas de incubación, ya había llegado a un valor no detectable por el método de recuento en placa; para el caso del tratamiento B, fue necesaria la incubación durante 4 horas para llegar al mismo valor. Es decir, en presencia de los ácidos orgánicos del SLC, el tiempo para alcanzar la máxima inhibición es mayor. Se podría hipotetizar que la presencia de otros ácidos orgánicos diferentes al ácido láctico, como el ácido acético, también contribuyen al valor de pH. Como el porcentaje de ácidos no disociados depende del valor de la constante de disociación (pka) de cada ácido orgánico presente y del pH del medio, aunque el valor final de pH sea el mismo, la cantidad de ácidos orgánicos débiles en forma no disociada será diferente entre el tratamiento B y el tratamiento D.

Respecto a *L. salivarius* 1234C (**Figura 12**), el cultivo completo demostró efecto antimicrobiano (tratamiento A). En los primeros treinta minutos de incubación, hubo un descenso de un orden logarítmico estadísticamente significativo en la concentración (10^6 UFC/ml), luego descendió tres órdenes de magnitud entre los treinta minutos y una hora, hasta llegar a la concentración del orden de 10^3 UFC/ml. Entre 1 y 2 horas de incubación, la concentración se mantuvo en el mismo orden, pero con una diferencia estadísticamente significativa entre los dos valores. Para el caso del tratamiento con el SLC (tratamiento B), la concentración se mantuvo sin diferencias significativas en el

orden de 10^8 UFC/ml, entre el tiempo cero y las 2 horas de incubación. Entre las 2 y 4 horas, disminuyó la concentración hasta no ser posible su detección por el método de recuento en placa, con un descenso de 8 órdenes logarítmicos. Esta situación se mantuvo hasta las 6 horas de incubación. En presencia de la fracción microbiana (tratamiento C), se observó un descenso significativo de la concentración de *S. Enteritidis* 105 dentro de los primeros treinta minutos de incubación a 37 °C, de 10^7 a 10^6 UFC/ml. Entre los treinta minutos y la primera hora, el descenso fue significativamente mayor, llegando a una concentración del orden de 10^2 UFC/ml; y entre la primera y segunda hora, la concentración se hizo no detectable por el método. En el caso del tratamiento D, el cual contenía el SLC acidificado artificialmente con ácido láctico, hubo un descenso significativo en la concentración durante los primeros treinta minutos, disminuyendo tres órdenes logarítmicos y obteniendo un recuento del orden de 10^4 UFC/ml. A partir de ese tiempo y hasta las 2 horas de incubación, no se detectó *Salmonella* viable en el medio. En el tratamiento E, la neutralización del SLC fermentado no tuvo efecto antibacteriano; aunque hubo diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones durante las 24 horas de incubación, la misma se mantuvo en el mismo orden logarítmico (10^8 UFC/ml).

Adicionalmente se constató la viabilidad de *S. Enteritidis* 105 durante toda la incubación a través del grupo Control K, manteniendo su concentración por encima del orden de 10^8 UFC/ml.

Al realizar la comparación entre el tratamiento A y el tratamiento B, se determinó que existe acción inhibitoria por parte de las bacterias, siendo mayor el efecto antibacteriano en presencia de los metabolitos liberados al SLC junto a las bacterias. A las 2 horas de incubación, el descenso en la concentración fue mayor en presencia del cultivo fermentado completo respecto al SLC solo. Esto también se puede concluir al comparar con el tratamiento C, donde a las 2 horas de coincubación junto al patógeno, disminuyó su concentración significativamente hasta no ser detectada por el método, mientras que en el tratamiento A se determinó una concentración de 4×10^3 UFC/ml al mismo tiempo. Al comparar el tratamiento B con el tratamiento E, la neutralización dejó sin efecto inhibitorio al SLC: durante las primeras 4 horas de incubación, la concentración de *S. Enteritidis* 105 en presencia del SLC neutralizado se mantuvo en el orden de 10^8 UFC/ml mientras que, en el SLC sin neutralizar, la concentración alcanzó un valor no detectable por el método de recuento en placa al finalizar las 4 horas. Se determinó que los ácidos orgánicos débiles, en su forma no disociada, ejercieron un fuerte efecto inhibitorio.

A un mismo valor de pH (3,9), el producto acidificado artificialmente con ácido láctico obtuvo mayor efecto inhibitorio que la suma de los ácidos orgánicos débiles presentes en el SLC. Al tiempo cero de incubación (al ponerse en contacto inmediatamente con el

patógeno), la concentración de *S. Enteritidis* 105 estuvo un orden de magnitud por debajo en el tratamiento D, respecto al tratamiento B, y a las 2 horas de incubación, se alcanzó un valor no detectable por el método de recuento en placa; para el caso del tratamiento B, fue necesaria la incubación durante 4 horas para alcanzar al mismo valor. Este comportamiento también se observó en el caso de *L. salivarius* 1231B.

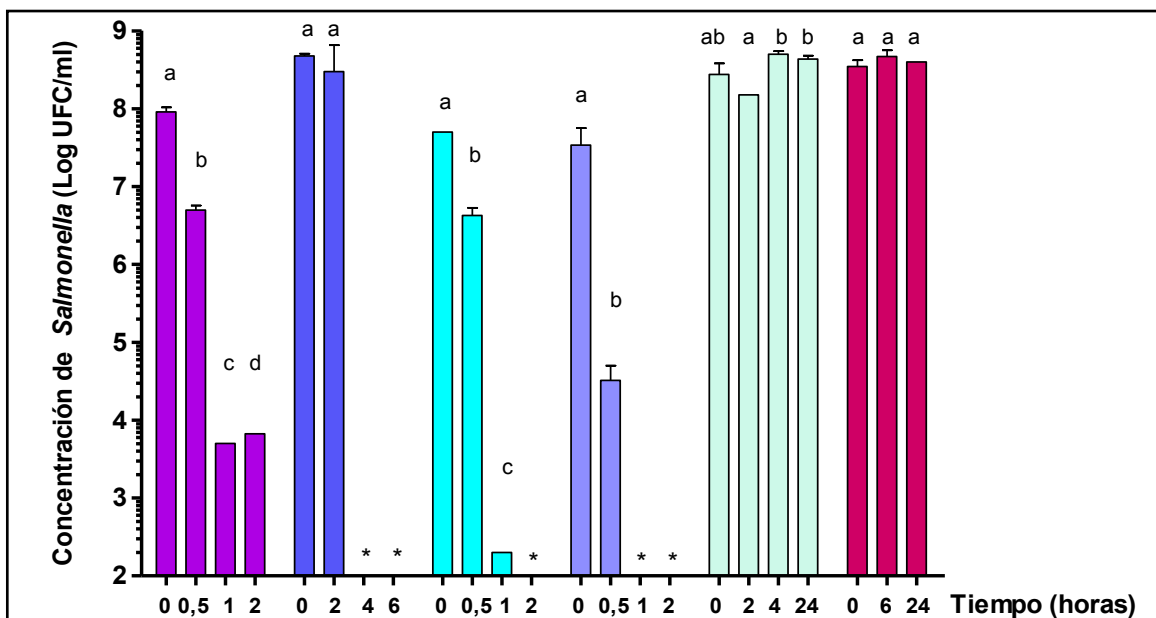


Figura 12. Efecto inhibitorio de la fracción microbiana y/o el SLC de *L. salivarius* 1234C en el desarrollo de *S. Enteritidis* 105 en coincubación en medio líquido. ■ Tratamiento A (*Salmonella* + cultivo completo), ■ Tratamiento B (*Salmonella* + SLC), ■ Tratamiento C (*Salmonella* + mo), ■ Tratamiento D (*Salmonella* + medio acidificado artificialmente), ■ Tratamiento E (*Salmonella* + SLC neutralizado), ■ Control K (*Salmonella*). Las barras verticales corresponden a la desviación estándar. Evaluación estadística: ANOVA de un solo factor, test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha = 0,05$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de incubación en un mismo tratamiento ($p < 0,05$). * indica que no se detectó crecimiento por el método de recuento en placa.

Respecto al efecto inhibitorio de *L. salivarius* 1235C frente a *S. Enteritidis* 105 (Figura 13), el cultivo completo no demostró efecto antimicrobiano (tratamiento A). En los primeros treinta minutos de incubación, no hubo un descenso estadísticamente significativo respecto a la concentración a tiempo cero (10^8 UFC/ml); entre los treinta minutos y la primera hora, la concentración disminuyó significativamente un orden de magnitud y, entre la hora 1 y 2, el recuento en el orden de 10^7 UFC/ml sin diferencia significativa. Durante las primeras 2 horas, la concentración del patógeno disminuyó un orden logarítmico. En el caso del tratamiento con el SLC (tratamiento B), la concentración se mantuvo sin diferencias significativas en el orden de 10^8 UFC/ml, entre el tiempo cero y las 4 horas de incubación; y entre las 4 y 6 horas, la concentración disminuyó significativamente un orden logarítmico de magnitud (10^7 UFC/ml). En

presencia de la fracción microbiana (tratamiento C), la concentración del patógeno se mantuvo en el orden de 10^8 UFC/ml dentro de la primera hora de incubación a 37°C , sin diferencias significativas entre la hora cero, treinta minutos y 1 hora; a las 2 horas de incubación, la cantidad de *Salmonella* viable disminuyó significativamente en aproximadamente 1 logaritmo de magnitud. En el caso del tratamiento D, el cual contenía el SLC acidificado artificialmente con ácido láctico, la concentración de *Salmonella* aumentó significativamente (un orden de magnitud) entre el tiempo cero y los primeros treinta minutos, alcanzado un valor de 1×10^9 UFC/ml; a la primera hora, disminuyó hasta un valor sin diferencias con el tiempo cero y luego descendió significativamente dos órdenes de magnitud, hasta llegar a un valor de 10^6 UFC/ml. En el tratamiento E, la neutralización del SLC fermentado no tuvo efecto antibacteriano; aunque hubo diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones durante las 24 horas de incubación, la misma se mantuvo en el orden logarítmico de 10^8 UFC/ml y aumentó al final de la incubación hasta alcanzar una concentración de 10^9 UFC/ml. La viabilidad de *S. Enteritidis* 105 se constató durante toda la incubación a través del grupo Control K, manteniendo su concentración por encima del orden de 10^8 UFC/ml.

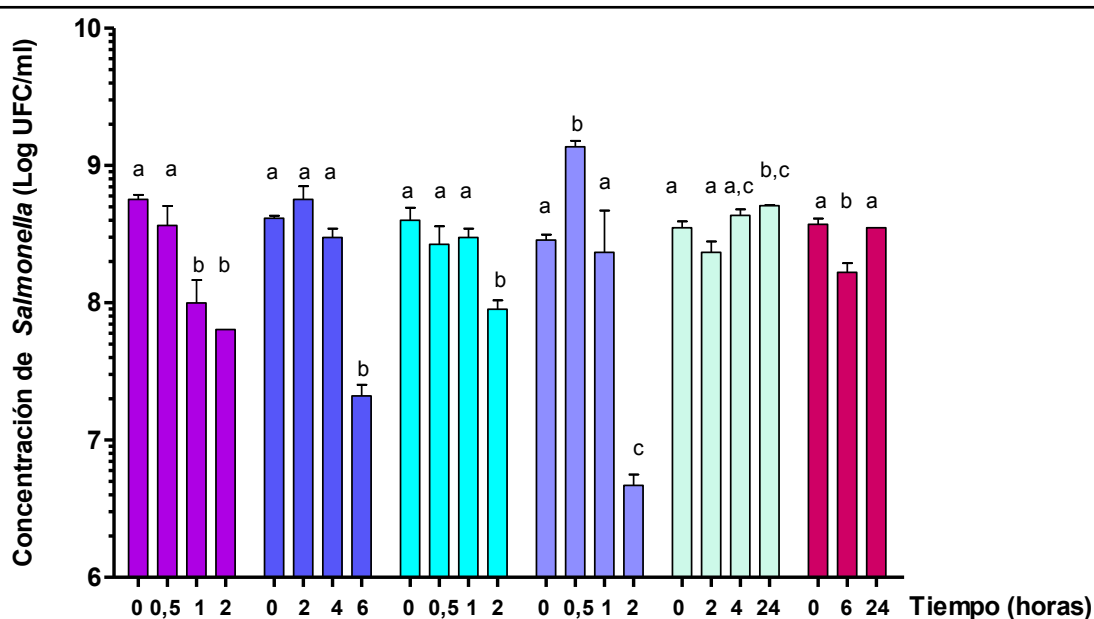


Figura 13. Efecto inhibitorio de la fracción microbiana y/o el SLC de *L. agilis* 1235C en el desarrollo de *S. Enteritidis* 105 en coincubación en medio líquido. ■ Tratamiento A (*Salmonella* + cultivo completo), ■ Tratamiento B (*Salmonella* + SLC), ■ Tratamiento C (*Salmonella* + mo), ■ Tratamiento D (*Salmonella* + medio acidificado artificialmente), ■ Tratamiento E (*Salmonella* + SLC neutralizado), ■ Control K (*Salmonella*). Las barras verticales corresponden a la desviación estándar. Evaluación estadística: ANOVA de un solo factor, test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha = 0,05$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de incubación en un mismo tratamiento ($p < 0,05$).

Al realizar la comparación entre el tratamiento A y el tratamiento B, se determinó acción inhibitoria por parte de las bacterias, es decir, la presencia de los microorganismos vivos contribuye al efecto inhibitorio generado por los metabolitos presentes en el SLC. A las 2 horas de incubación a 37 °C, se produjo un descenso en la concentración del patógeno mayor en presencia del cultivo fermentado completo (5×10^7 UFC/ml) respecto al SLC solo (6×10^8 UFC/ml). Esto también se puede evidenciar al comparar con el tratamiento C, donde a las 2 horas de coincubación junto al patógeno, la concentración alcanzó un valor de 1×10^8 UFC/ml.

Al comparar el tratamiento B con el tratamiento E, durante las primeras 4 horas de incubación, la concentración de *S. Enteritidis* 105 en presencia del SLC neutralizado y sin neutralizar se mantuvo en un mismo orden (10^8 UFC/ml). Sin embargo, a las 6 horas de incubación en presencia del SLC sin neutralizar, la concentración disminuyó significativamente llegando a 1×10^7 UFC/ml; mientras que con el SLC neutralizado a las 24 horas, la concentración del patógeno no demostró diferencia significativa con la obtenida a las 4 horas de incubación. Nuevamente se evidenció el efecto antibacteriano de los ácidos orgánicos débiles, en su forma no disociada.

Como se observó previamente con el aislado *L. salivarius* 1234C, el medio acidificado artificialmente con ácido láctico (Tto D) demostró un mayor poder inhibitorio que el obtenido con el SLC (Tto B) a pH 4,4. A las 2 horas de incubación, la concentración del patógeno en el Tto D estuvo dos órdenes por debajo respecto al obtenido con el Tto B. Al finalizar las 6 horas de incubación en el Tto B (1×10^7 UFC/ml), el efecto inhibitorio fue menor que el obtenido en el Tto D a las 2 horas (4×10^6 UFC/ml).

Haciendo una revisión bibliográfica respecto a esto estudios, podemos encontrar trabajos con resultados variables. Adetoye et al. (2018) evaluaron el efecto de la coincubación de las especies *L. salivarius* C86 y *L. amylovorus* C94 (aisladas de materia fecal fresca de ganado vacuno), frente a dos cepas de *Salmonella enterica* spp., en concentraciones similares a las ensayadas en este trabajo. En el trabajo mencionado se demostró un potente efecto antibacteriano por parte de ambas cepas de lactobacilos: disminuyendo en ocho órdenes logarítmicos la concentración del patógeno al pasar de las 8 a las 16 horas de incubación. Al comparar estos resultados con los obtenidos en esta Tesis, la reducción del *S. Enteritidis* 105, en presencia de sólo los microorganismos, se alcanzó en un tiempo menor para el caso de *L. salivarius* 1231B (4 horas) y *L. salivarius* 1234C (2 horas). En todos los casos evaluados en esta Tesis, el efecto inhibitorio fue muy marcado a tiempos cortos de contacto entre el patógeno y el lactobacilo.

En otro estudio, Coman et al. (2014), determinó el efecto de *L. rhamnosus* IMC 501, *L. paracasei* IMC 502 y el producto probiótico formado por las dos cepas (SYNBIO®) frente al crecimiento de *S. enterica* serovar Enteritidis DSM 14221. Cada lactobacilo/producto probiótico se coincubó con la cepa patógena a iguales concentraciones (1×10^8 UFC/ml). Los autores observaron que, luego de 24 horas a 37 °C, los porcentajes de inhibición obtenidos fueron mayores al 80 % en presencia de las dos cepas y el producto probiótico, demostrando un fuerte efecto de inhibición.

En la investigación realizada por Olivares et al. (2006) se estudió el efecto inhibitorio frente a *S. choleraesuis* CECT4155 de los SLC neutralizados (pH 7) obtenidos a partir del crecimiento de cepas de *L. salivarius*, *L. fermentum*, *L. gasseri* y *L. coryniformis* (aisladas de leche materna). Al cabo de 6 horas, el patógeno aumentó su concentración en un orden de magnitud en presencia de SLC de *L. salivarius* y *L. fermentum*; para el resto de las cepas, la concentración se mantuvo igual a la inicial.

A las 24 horas, no se detectó crecimiento en presencia de los SLC neutralizados de *L. gasseri* y hubo una disminución (hasta un 20%) en el caso de los cultivos incubados con los SLC de los restantes lactobacilos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta Tesis, donde en presencia de los SLC neutralizados de *L. salivarius* 1231B y 1234C, no hubo crecimiento de *S. Enteritidis* 105 durante las 24 horas de coincubación; sin embargo, el patógeno fue capaz de crecer en coincubación con el SLC neutralizado de *L. agilis* 1235C; este efecto podría explicarse teniendo en cuenta que, al neutralizar el SLC, disminuye la concentración de ácidos orgánicos débiles en solución, los cuales serían los responsables del efecto inhibitorio.

Abdel-Daim et al. (2013) estudiaron el efecto de doce cepas de *L. plantarum* en el desarrollo de *S. typhi* (SS6). Para ello, a partir de inóculos de concentración de 10^5 UFC/ml, se realizaron coincubaciones en medio líquido durante 24 horas y se determinó la concentración del patógeno y de los lactobacilos. Los resultados demostraron que solo nueve de los aislados inhibieron el crecimiento de *S. typhi* SS6 significativamente luego de las 24 horas de incubación, obteniendo diferencias en la concentración en el rango de 2 a 7 órdenes logarítmicos menos respecto al control (concentración de 9 órdenes logarítmicos). Además, estos autores observaron que el crecimiento de los *Lactobacillus* evaluados no se vio afectado por la presencia de la cepa patógena durante la coincubación. De acuerdo a los resultados de esta investigación, el efecto inhibitorio es cepa dependiente. Un comportamiento similar se observó en esta Tesis con los distintos aislados de *L. salivarius* (1231B, 1232Y y 1234C).

Drago et al. (1997) investigó el efecto de *L. paracasei* (B21060 y B21070) y *L. acidophilus* (B21190) respecto al crecimiento en coincubación con una cepa de *S. Enteritidis* y observó que los lactobacilos, independientemente, lograron inhibir el

crecimiento del patógeno luego de 24 horas de coincubación, con una disminución de seis órdenes logarítmicos. Sin embargo, la mezcla de lactobacilos ejerció un mayor efecto respecto a las cepas individuales inhibiendo casi por completo el crecimiento de *S. Enteritidis* a las 24 y 48 horas, con una disminución de siete órdenes logarítmicos en el crecimiento en comparación con los controles. El trabajo de Drago et al. (1997) destaca la importancia de trabajar con un producto probiótico multicepa, con el cual se puede alcanzar un mayor efecto inhibitorio respecto a las cepas de forma individual.

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos concluir que *L. salivarius* 1231B, 1232Y y 1234C fueron los aislados con el mayor efecto inhibitorio frente a *Salmonella* Enteritidis 105. Tanto la fracción microbiana como los metabolitos presentes en los SLC contribuyeron a este efecto. También debe destacarse que la inhibición fue a tiempos cortos de incubación (tiempo máximo de cuatro horas), en comparación con otros trabajos publicados.

2.3.2 Actividad inhibitoria de los sobrenadantes libres de células (SLC): porcentaje de reducción del crecimiento

Las especies pertenecientes al género *Lactobacillus* producen y secretan al medio de cultivo compuestos que poseen un amplio espectro de aplicación debido a su efectiva actividad antimicrobiana y antifúngica (Vandenbergh et al., 1993; Wang et al., 2012; Leyva Salas et al., 2017; Russo et al., 2017; Tan et al., 2017; Koohestani et al., 2018). Dentro de estos compuestos se pueden mencionar las bacteriocinas (Toba et al., 1991; Vignolo et al., 1996; Udhayashree et al., 2012; Kang et al., 2017), los ácidos orgánicos (Neal-McKinney et al., 2012; Poppi et al., 2015; Guimarães et al., 2018; Hu et al., 2019) y el peróxido de hidrógeno (Pridmore et al., 2008; Suskovich et al., 2010; Er et al., 2019). Las especies pertenecientes al género *Enterococcus*, las cuales forman parte del grupo de las bacterias lácticas, también son capaces de producir compuestos antimicrobianos e inhibir el crecimiento de patógenos como *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Audisio et al., 1999; Abdel-Hamid et al., 2018; Indira et al., 2018).

Por lo tanto, es interesante evaluar la actividad inhibitoria de los SLC del cultivo de los aislados frente a microorganismos potencialmente patógenos de importancia avícola. Se utilizaron para los ensayos una cepa de *E. coli*, aislada de un brote aviar y diferentes cepas de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (cepa 101, 105 y 106) y Gallinarum (cepa 111).

Inicialmente, se puso a punto la técnica realizando una evaluación con el SLC de *L. salivarius* 1231B en el medio MRS comercial, que es el medio de cultivo utilizado regularmente para el crecimiento de lactobacilos. A fin de seleccionar las diluciones de los SLC que se iban a evaluar, se utilizó en concentración directa (sin diluir) y diluciones seriadas: 1/5, 1/10, 1/20 y 1/100 (**Figura 14**). El patógeno empleado para esta determinación fue *S. Enteritidis* 105, en concentración 1×10^7 UFC/ml.

La actividad inhibitoria de los SLC y sus diluciones fue expresada como el porcentaje de reducción del crecimiento (% RC) medido a una longitud de onda de 620 nm comparado con el control positivo, de acuerdo a la **Ecuación 1 (Sección 2.2.4) (Figura 14)**. La reducción del crecimiento se informó como positiva (mayor al 20 %), baja (entre 20 % y 40 %), media (entre el 40 % y 70 %) y fuerte (mayor al 70 %) (Gerez et al., 2009; Gamba Villaroel et al., 2016); los valores límites de esta clasificación se indican con líneas punteadas en los gráficos.

Adicionalmente, se determinó si el efecto inhibitorio del SLC y/o sus diluciones fue de carácter bacteriostático ("-STATICO", inhibición del crecimiento microbiano en presencia del SLC) o bactericida ("-CIDA", muerte bacteriana).

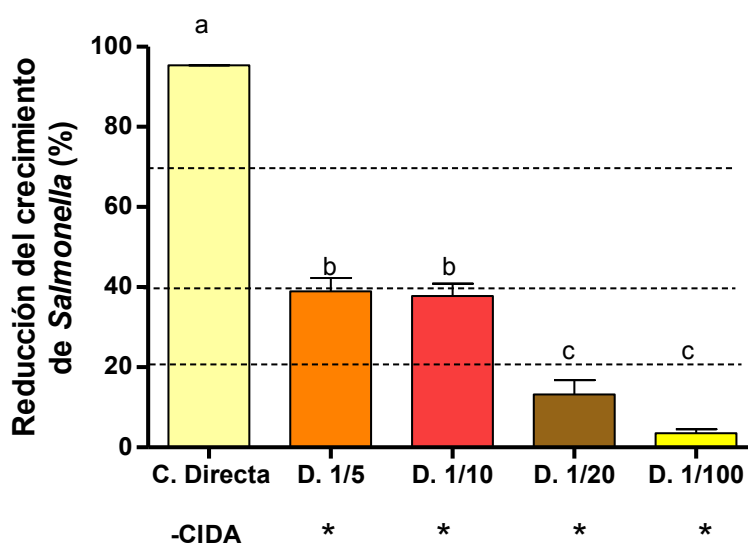
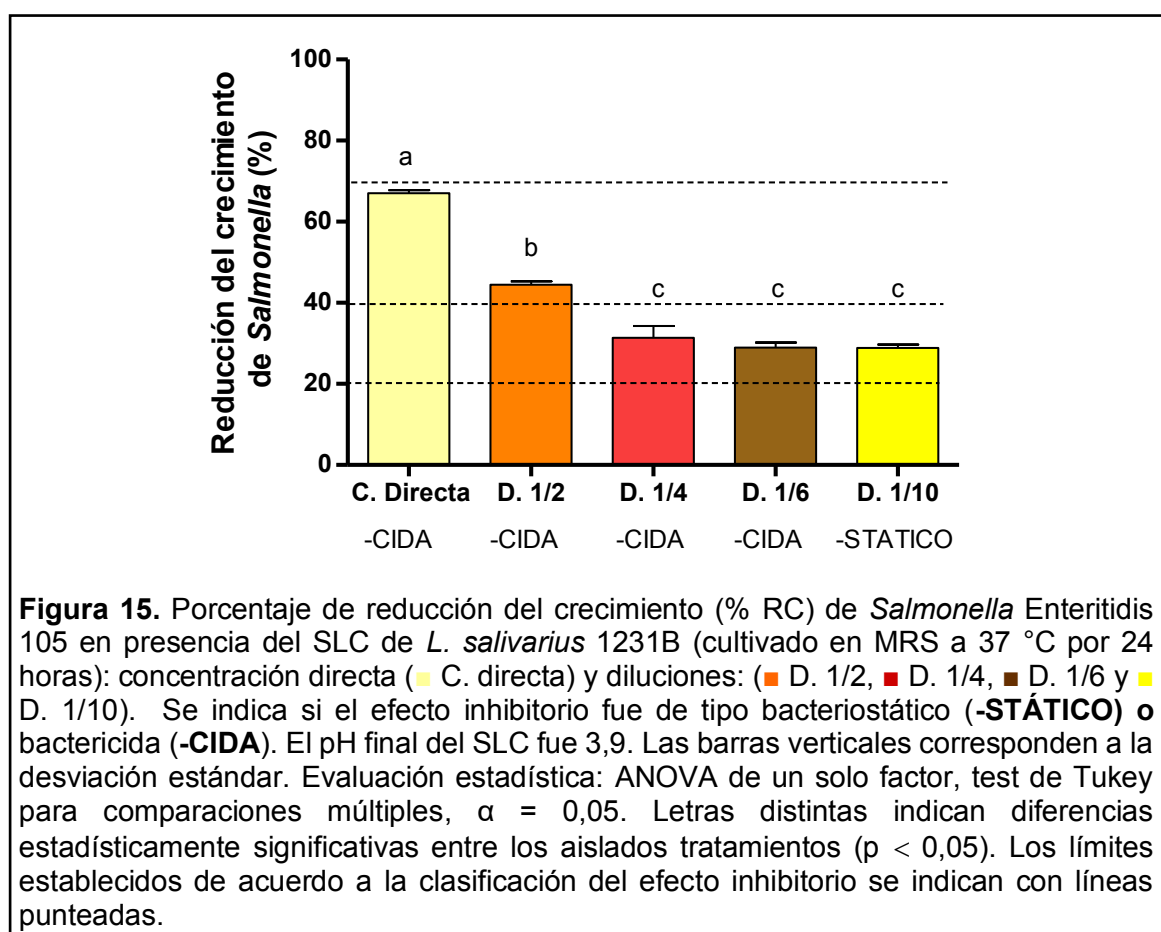


Figura 14. Porcentaje de reducción del crecimiento (% RC) de *S. Enteritidis* 105 en presencia del SLC de *L. salivarius* 1231B (cultivado en MRS a 37 °C por 24 horas): en concentración directa (■ C. Directa) y diluciones: (■ D. 1/5, ■ D. 1/10, ■ D. 1/20 y ■ D. 1/100). Debajo de las barras se indica si el efecto inhibitorio fue de tipo bactericida (-CIDA) o si hubo crecimiento a simple vista (*). El pH final del SLC fue 3,9. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar. Evaluación estadística: ANOVA de un solo factor, test de Tukey para comparaciones múltiples, $\alpha = 0,05$. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$). Los límites establecidos de acuerdo a la clasificación del efecto inhibitorio se indican con líneas punteadas.

De acuerdo a la **Figura 14**, al desafiar *S. Enteritidis* 105 con el SLC en concentración directa, el porcentaje de reducción del crecimiento fue 95,4 % ($\pm 0,1$ %), indicando una fuerte inhibición. Dicha capacidad inhibitoria se redujo significativamente a valores cercanos al 40 %, entre las diluciones 1/5 (38,9 % $\pm 6,7$ %) y 1/10 (37,8 % $\pm 6,9$ %), en cuyos casos, la reducción del crecimiento se consideró baja. Y para las diluciones 1/20 y 1/100 se obtuvieron valores de 13,2 % ($\pm 3,5$ %) y 8,0 % ($\pm 1,4$ %), respectivamente, considerándose que no hubo inhibición del crecimiento. A partir de los pocillos que no evidenciaron crecimiento a simple vista (sólo los correspondientes al SLC en concentración directa), se sembró una alícuota con un ansa estéril en el medio de cultivo Hektoen Entérico a fin de determinar si la inhibición fue de carácter bactericida o bacteriostático. Los resultados permitieron concluir que el SLC de *L. salivarius* 1231B, en concentración directa, presentó efecto bactericida frente a esta cepa de *Salmonella*, es decir, que los metabolitos presentes en el sobrenadante fueron capaces, no sólo de inhibir el desarrollo del patógeno en su presencia, sino causar su muerte.

En base a que el efecto de inhibición fue negativo a diluciones del SLC mayores a 1/10, se decidió ajustar el rango de las concentraciones evaluadas. Se ensayó el efecto inhibitorio del SLC en concentración 1/2, 1/4, 1/6 y 1/10 (**Figura 15**).



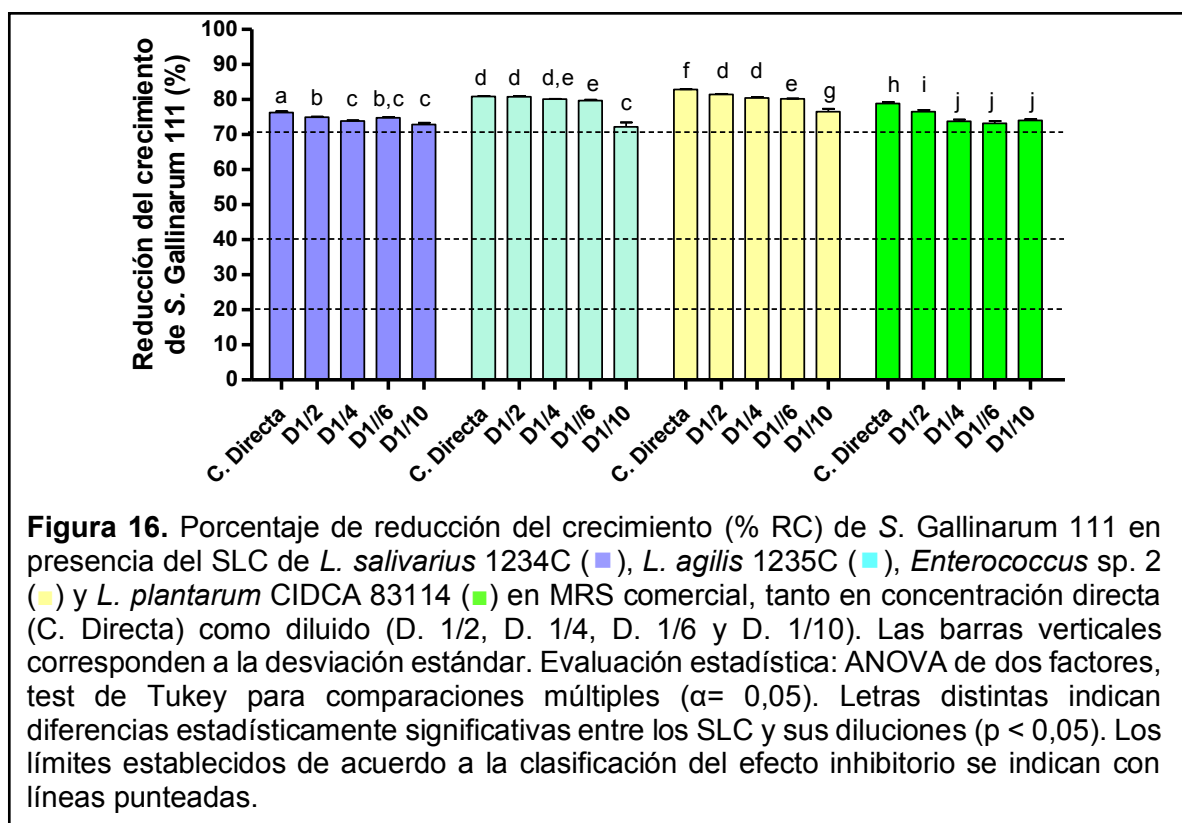
De acuerdo a la **Figura 15**, todas las diluciones evaluadas del SLC de *L. salivarius* 1231B en el medio MRS presentaron un porcentaje de reducción del crecimiento de *S. Enteritidis* 105 mayor al 20 %, indicando que los productos de la fermentación de esta cepa (pH 3,9) ejercieron acción antibacteriana.

El mayor porcentaje de reducción del crecimiento de *S. Enteritidis* 105 se obtuvo utilizando el SLC en concentración directa, con un valor de 67,1 % ($\pm 1,4$ %). Al diluir el SLC a la mitad, se obtuvo un porcentaje de 44,5 % ($\pm 1,6$ %). A partir de la dilución 1/4, el efecto se consideró bajo, con valores de porcentaje de reducción de 31,3 % ($\pm 5,9$ %), 28,9 % ($\pm 2,1$) y 28,8 % ($\pm 1,4$ %) para el SLC en concentración 1/4, 1/6 y 1/10, respectivamente.

Adicionalmente, se evaluó el efecto bacteriostático / bactericida de todas las concentraciones del SLC ya que en todos los pocillos no se observó crecimiento microbiano a simple vista. Se sembró una alícuota con un ansa estéril en el medio de cultivo Hektoen Entérico. El SLC de *L. salivarius* 1231B, tanto en concentración directa como en las concentraciones 1/2, 1/4 y 1/6 demostraron efecto bactericida; mientras que la concentración 1/10 mostró efecto bacteriostático.

Este resultado nos indica que se podría utilizar el SLC de *L. salivarius* 1231B diluido hasta 1/6 y el efecto sería el mismo que se obtiene trabajando en concentración directa, es decir, sin diluir. Este es un dato importante teniendo en cuenta que los volúmenes con los que se trabaja a nivel productivo son elevados y poder diluir el SLC generaría un mayor rendimiento a partir del cultivo del aislado.

Una vez realizado el ajuste inicial de las concentraciones del SLC, se procedió a evaluar el efecto de los SLC de *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C, *Enterococcus* sp. 2 y *L. plantarum* CIDCA 83114 frente a *S. Gallinarum* 111. Los resultados se presentan en la **Figura 16**.



Todos los SLC evaluados, incluso los diluidos hasta 1/10, demostraron una reducción del crecimiento de *S. Gallinarum* 111 de más del 70 % luego de una incubación de 24 horas a 37 °C (Figura 16).

Adicionalmente, se evaluó si el efecto inhibitorio de los SLC fue de tipo bacteriostático o bactericida frente a este aislado de *Salmonella* (Tabla 13).

Tabla 13. Carácter del efecto inhibitorio frente a *S. Gallinarum* 111 de los SLC obtenidos a partir de la fermentación de *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C, *Enterococcus* sp. 2 y *L. plantarum* CIDCA 83114 en el medio MRS comercial.

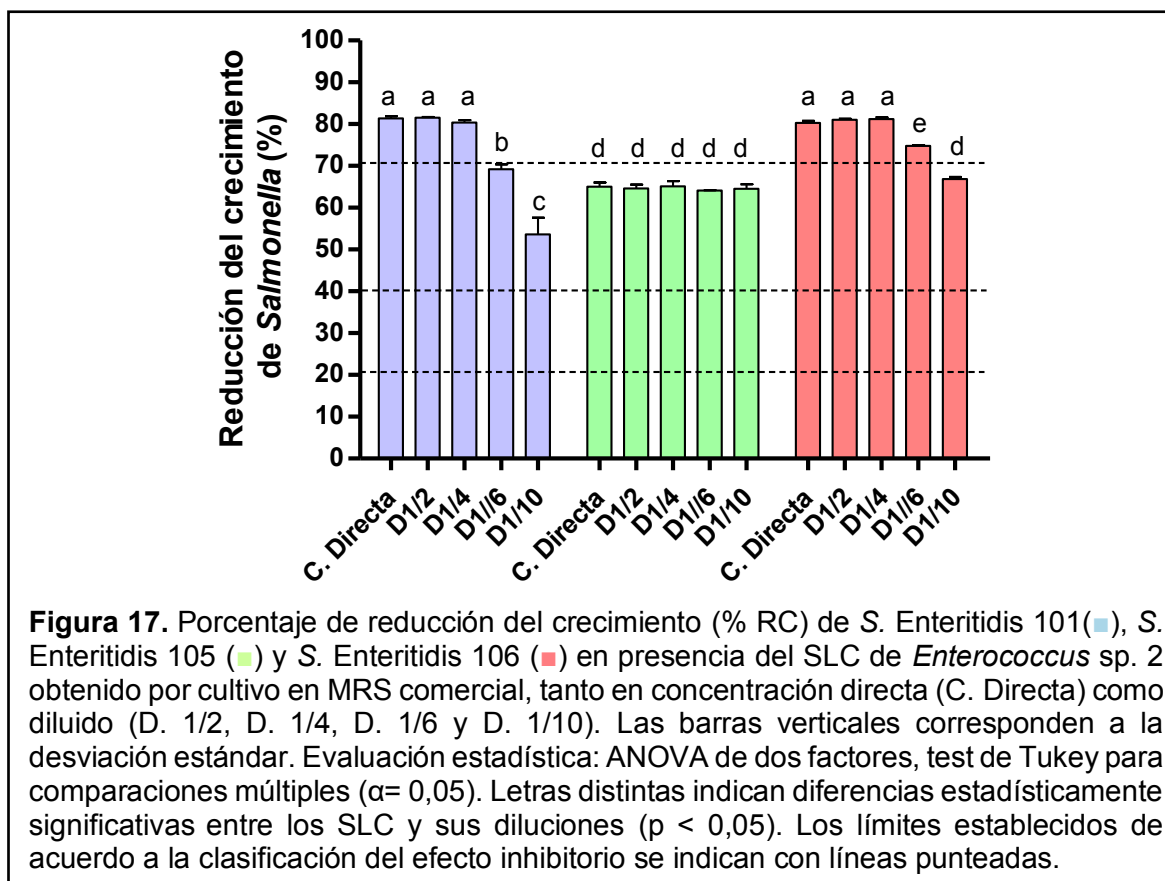
Aislado	pH	SLC				
		C. Directa	Dilución 1/2	Dilución 1/4	Dilución 1/6	Dilución 1/10
<i>L. salivarius</i> 1234C	3,9	-cida	-cida	-cida	-statico	-statico
<i>L. agilis</i> 1235C	4,6	-cida	-cida	-statico	-statico	-statico
<i>Enterococcus</i> sp. 2	4,4	-cida	-cida	-statico	-statico	-statico
<i>L. plantarum</i> CIDCA 83114	3,9	-cida	-cida	-cida	-statico	-statico

Todos los SLC sin diluir y diluidos 1/2 demostraron efecto de tipo bactericida; inclusive, se halló este efecto en la dilución 1/4 de los SLC obtenidos a partir del cultivo de *L. salivarius* CM-CIDCA 1234C y *L. plantarum* CIDCA 83114. El resto de las diluciones de los SLC evaluados demostraron acción bacteriostática hasta en la dilución 1/10, que fue la mayor dilución evaluada.

Si quisiéramos comparar el efecto que tiene un mismo SLC de un aislado frente a dos patógenos diferentes, se podría observar que, para el caso del SLC de *L. salivarius* 1234C, el efecto bactericida frente a *E. coli* se observó hasta en la dilución 1/2 inclusive, siendo de carácter fuerte (mayor al 70%) hasta la dilución 1/6; mientras que frente a la cepa *S. Gallinarum* 111, el efecto bactericida se halló hasta en la dilución 1/4 del SLC y todas las diluciones evaluadas en el ensayo tuvieron un fuerte efecto de reducción, con porcentajes mayores al 70%. El SLC de *L. agilis* 1235C demostró efecto bactericida frente a *E. coli* y *S. Gallinarum* 111 hasta en la dilución 1/2 (inclusive) y los porcentajes de reducción fueron mayores al 70% hasta en la dilución 1/10. El SLC de *Enterococcus* sp. 2 presentó efecto bactericida hasta en la dilución 1/2 respecto al crecimiento de los dos patógenos y porcentajes de reducción mayores al 70% hasta la dilución 1/4 para *E. coli* y hasta 1/10 para *S. Gallinarum*.

En conclusión, si se quisieran utilizar los SLC de *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C y *Enterococcus* sp. 2 para eliminar *E. coli*, podrían diluirse hasta 1/2; en cambio, si se quisieran utilizar para eliminar *S. Gallinarum* 111, el SLC de *L. agilis* 1235C y *Enterococcus* podrían utilizarse hasta diluidos 1/2 (como para *E. coli*) y el de *L. salivarius* 1234C podría diluirse hasta 4 veces para generar el efecto bactericida.

Para el estudio del efecto inhibitorio del SLC de *Enterococcus* sp. 2 y las diluciones obtenidas a partir del cultivo en medio MRS, se amplió el número de cepas patógenas a evaluar: *S. Enteritidis*: *S. Enteritidis* 101, *S. Enteritidis* 105 y *S. Enteritidis* 106. Los resultados se presentan en la **Figura 17**.



Los resultados fueron dependientes de la serovariedad del patógeno: para el caso de *S. Enteritidis* 101, se obtuvo una fuerte reducción del crecimiento hasta la dilución 1/4 del SLC del *Enterococcus* sp. 2, con porcentajes de reducción del 80 %, y una reducción del crecimiento media al diluir el SLC en 1/6 y 1/10. Por otro lado, la presencia del SLC y todas sus diluciones provocaron una reducción del crecimiento media de *S. Enteritidis* 105, con valores en el rango de 40 – 70 %, sin hallar diferencias significativas. Además, para el caso de *S. Enteritidis* 106, se observó un comportamiento similar a *S. Enteritidis* 101, donde se obtuvo una fuerte reducción del crecimiento hasta la dilución 1/6 del SLC del *Enterococcus* sp. 2., con porcentajes de reducción del 80 %, y un efecto de reducción medio al diluir el SLC en 1/10.

También se evaluó si el efecto inhibitorio del SLC fue de tipo bacteriostático o bactericida frente a estas cepas de *Salmonella* (Tabla 14).

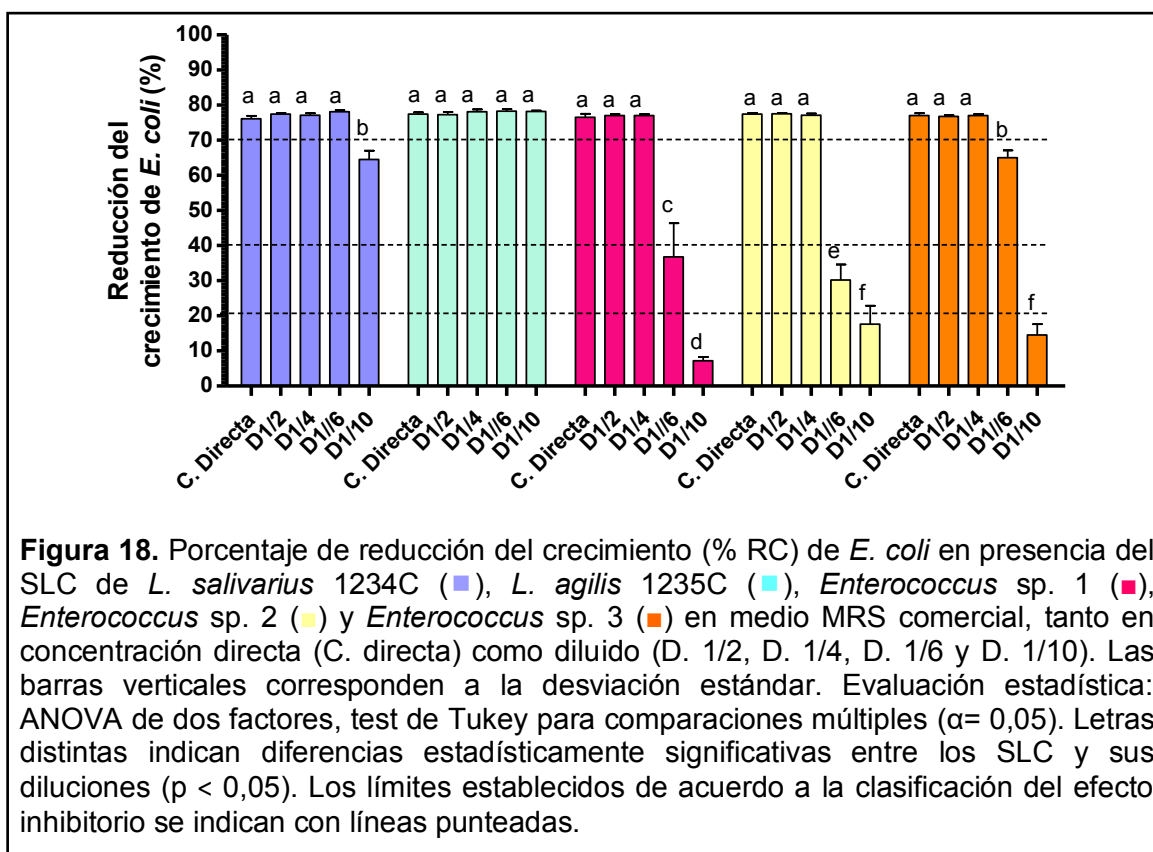
Tabla 14. Carácter del efecto inhibitorio frente a *S. Enteritidis* 101, *S. Enteritidis* 105 y *S. Enteritidis* 106 del SLC obtenido a partir de la fermentación de *Enterococcus* sp. 2 (pH 4,0) en el medio MRS comercial.

Cepa	SLC				
	C. Directa	Dilución 1/2	Dilución 1/4	Dilución 1/6	Dilución 1/10
	<i>S. Enteritidis</i> 101	-cida	-statico	-statico	-
<i>S. Enteritidis</i> 105	-cida	-cida	-cida	-statico	-statico
<i>S. Enteritidis</i> 106	-cida	-statico	-statico	-	-

Nota: las diluciones de los SLC que no evidenciaron, a simple vista, efecto inhibitorio no fueron evaluadas y se indican como (-).

Se puede observar que, aunque el efecto del SLC de *Enterococcus* sp. 2 y sus diluciones frente a *S. Enteritidis* 105 se encontró en el rango medio de reducción del crecimiento (40 – 70 %) (**Figura 17**), éste fue de acción bactericida hasta la dilución 1/4 y bacteriostática con las diluciones 1/6 y 1/10. En cambio, en los casos de *S. Enteritidis* 101 y *S. Enteritidis* 106, donde se había informado un fuerte efecto de reducción del crecimiento hasta diluciones 1/4 y 1/6 de los SLC (porcentajes mayores al 70 %), respectivamente, se determinó que el efecto de inhibición fue de carácter bactericida sólo en concentración directa; y efecto bacteriostático para las diluciones 1/2 y 1/4 de los SLC. De modo que, el efecto del SLC de *Enterococcus* sp. 2 frente a *S. Enteritidis* es cepa dependiente: si quisiera causar la muerte bacteriana de *S. Enteritidis* 101 y 106, el SLC debería utilizarse sin ser diluido; en cambio, para actuar frente a *S. Enteritidis* 105, podría diluirse hasta 1/4 y se alcanzaría el mismo efecto bactericida que en concentración directa.

También se estudió el efecto inhibitorio de los SLC frente a una cepa de *E. coli* aislada durante esta Tesis a partir de un brote en una granja avícola. En este caso, se evaluó el efecto de los SLC obtenidos a partir del crecimiento en medio MRS comercial de *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C, *Enterococcus* sp. 1, *Enterococcus* sp. 2 y *Enterococcus* sp. 3 en el crecimiento de este aislado (**Figura 18**).



De acuerdo a los resultados, los SLC de todos los aislados hasta la dilución 1/4 demostraron una fuerte reducción del crecimiento de *E. coli*, con valores porcentuales por arriba del 70 %. A mayores diluciones del SLC (1/6 y 1/10), el efecto inhibitorio se redujo significativamente para el caso de los *Enterococcus* sp., a niveles de bajo efecto para *Enterococcus* sp. 1 y *Enterococcus* sp. 2 en dilución 1/6 y efecto negativo a la mayor dilución; en el caso del *Enterococcus* sp. 3, el SLC diluido 1/6 y 1/10 demostró un efecto de reducción medio y negativo, respectivamente.

En el caso de *Lactobacillus* sp., hasta en la dilución 1/6 se observó un fuerte efecto de reducción, con valores por encima del 70 %. Para *L. agilis* 1235C, se observó una reducción fuerte (mayor al 70 %) hasta la dilución 1/10, inclusive; en cambio, *L. salivarius* 1234C demostró un efecto de reducción medio (en el rango 40 – 70 %) a la mayor dilución del SLC evaluada.

Adicionalmente, se evaluó si el efecto inhibitorio de los SLC fue de tipo bacteriostático o bactericida frente a *E. coli* (Tabla 15).

Tabla 15. Carácter del efecto inhibitorio frente a *E. coli* de los SLC obtenidos a partir de la fermentación de *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C, *Enterococcus* sp. 1, *Enterococcus* sp. 2 y *Enterococcus* sp. 3 en el medio MRS comercial.

Aislado	pH	SLC				
		C. directa	Dilución 1/2	Dilución 1/4	Dilución 1/6	Dilución 1/10
<i>L. salivarius</i> 1234C	4,0	-cida	-cida	-statico	-statico	-
<i>L. agilis</i> 1235C	3,8	-cida	-cida	-statico	-statico	-statico
<i>Enterococcus</i> sp. 1	4,5	-cida	-cida	-statico	-	-
<i>Enterococcus</i> sp. 2	4,5	-cida	-cida	-statico	-	-
<i>Enterococcus</i> sp. 3	4,4	-cida	-cida	-statico	-statico	-statico

Nota: las diluciones de los SLC que no evidenciaron, a simple vista, efecto inhibitorio no fueron evaluadas y se indican como (-).

Los resultados demostraron que se podrían utilizar los SLC de cualquiera de los aislados evaluados frente a *E. coli*, tanto sin diluir como diluidos 1/2, obteniendo un efecto bactericida. Este dato es importante, teniendo en cuenta que este aislado de *E. coli* fue resistente a la acción de diferentes antibióticos (Trimethoprim sulfa, ampicilina, cafalosporina de primera y moderada resistencia a norfloxacin). Entonces, el uso de los SLC sería una alternativa eficaz al empleo de los antibióticos.

Respecto a los resultados obtenidos frente a *S. Gallinarum* 111 y *E. coli* (Tabla 13 y Tabla 15), el SLC de *Enterococcus* sp. 2 podría utilizarse diluido 1/2 para ejercer efecto bactericida; reforzando la idea de que la concentración de SLC elegida dependerá del patógeno que se quiera inhibir/matar ya que diferentes cepas de *Salmonella* y *E. coli* demostraron tener diferente susceptibilidad frente al SLC de un mismo lactobacilo.

Estos resultados coinciden con los hallados en otras investigaciones donde se ha estudiado la acción de SLC obtenidos de cultivos de distintas cepas de bacterias lácticas frente a *E. coli*. De acuerdo a la investigación realizada por Roldán et al. (2011), el SLC de *L. casei* 206/1 ejerció efecto bactericida frente al crecimiento de *E. coli* O157:H7 al cabo de 24 horas de incubación a 37 °C. El resultado es coincidente con el obtenido en esta Tesis, donde todos los SLC en concentración directa presentaron efecto bactericida.

Por su parte, Inturri et al. (2019) evaluó la capacidad de inhibición de los SLC (y varias diluciones) obtenidos a partir del cultivo de *Bifidobacterium longum* BB536 y *L. rhamnosus* HN001, ya sea separados o en combinación, frente a aislados clínicos de *E. coli*. El efecto inhibitorio resultó estar dentro del rango de muy fuerte (SLC en dilución 1/8) a fuerte (SLC en dilución 1/4). Este autor, reportó que los SLC neutralizados aumentaron ligeramente su actividad antibacteriana con respecto a los SLC sin

neutralizar. Sin embargo, en otro trabajo, Poppi et al. (2015) evaluó el efecto de los SLC de bacterias lácticas (*L. plantarum*, *L. delbruecki* subsp. *delbruecki*, *L. reuteri*, *L. casei* subsp. *pseudopantarum*), aisladas de cama de pollos, frente al desarrollo de una cepa de *E. coli* O157:H7 y los resultados demostraron que los SLC ejercieron un importante efecto inhibitorio, pero, al ser neutralizados, el efecto disminuyó significativamente hasta llegar a ser nulo en algunos casos. Demostrando, de esta forma, la importancia de los ácidos orgánicos débiles en el proceso de inhibición. Adicionalmente, en el trabajo mencionado anteriormente (Poppi et al., 2015) se comprobó que la acción conjunta de los SLC combinados obtuvo mayor actividad inhibitoria frente a *E. coli* O157:H7, respecto a los SLC en forma individual, independientemente de la neutralización. Este resultado prueba la importancia de trabajar con un producto probiótico multicepa, a partir del cual se generó un efecto sinérgico respecto a la inhibición del patógeno.

Teniendo en cuenta los resultados hallados en el **Capítulo 1** respecto al uso de medios de cultivo alternativos (**Sección 1.3.5**), se quiso investigar si el efecto inhibitorio de los SLC obtenidos a partir del crecimiento de los aislados en MRS comercial se podía producir a partir del crecimiento de los mismos en otros medios de cultivo. Por lo tanto, se evaluó el efecto inhibitorio de los SLC obtenidos a partir de la fermentación de los aislados *L. salivarius* 1231B, *L. salivarius* 1232Y, *L. salivarius* 1233C, *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C, *L. johnsonii* 1236B, *L. johnsonii* 1237Y, *L. salivarius* 1238C y *L. reuteri* / *vaginalis* 1239Y en el medio permeado de suero suplementado con extracto de levadura. La fermentación se realizó a 37 °C durante 48 horas. La concentración del inóculo de trabajo de la cepa patógena fue 1×10^8 UFC/ml, valor utilizado en el ensayo de muerte bacteriana de *Salmonella* en coinubación con los aislados (**Sección 2.3.1**). Los resultados obtenidos fueron expresados en las **Figuras 19** y **20**.

Algunos de estos SLC fueron almacenados para evaluar la concentración de ácidos orgánicos débiles mediante HPLC (ver **Sección 2.3.3**).

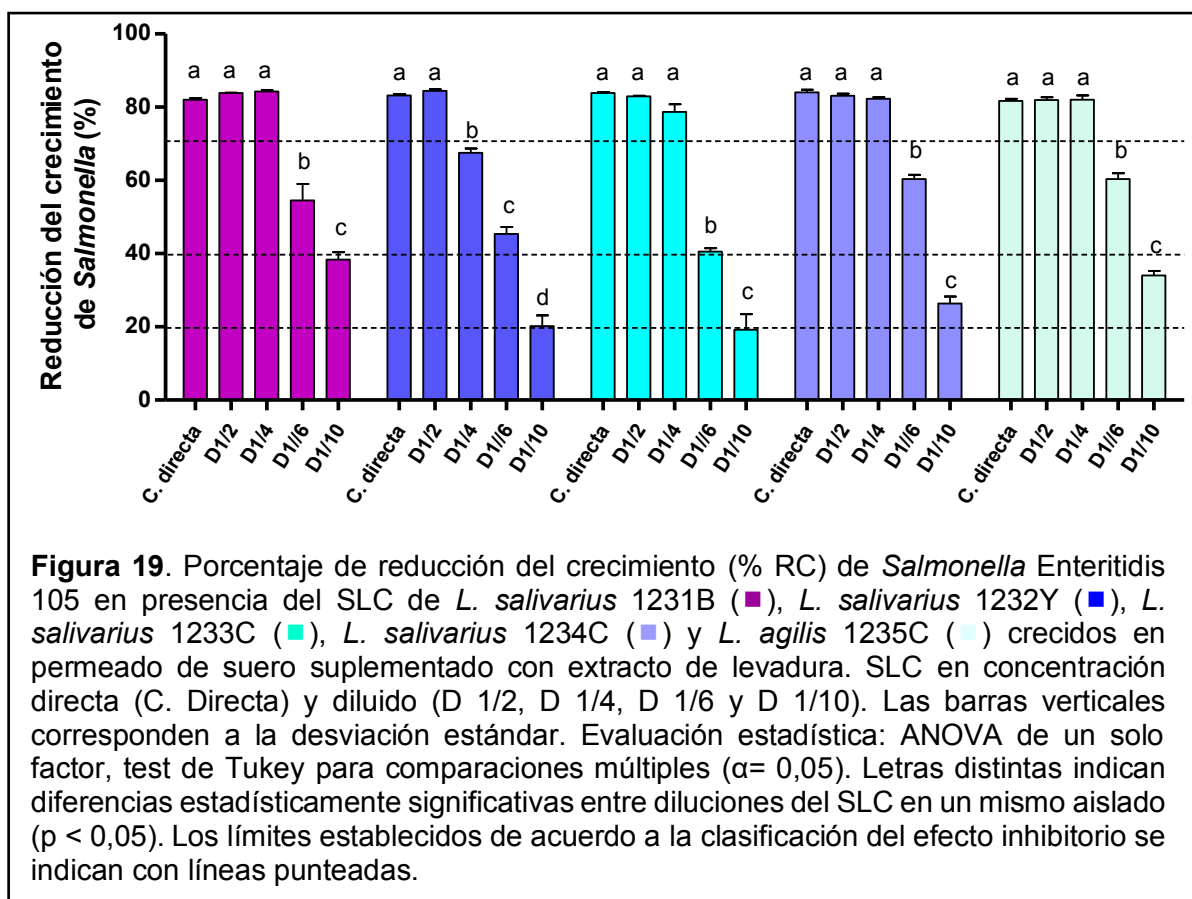


Figura 19. Porcentaje de reducción del crecimiento (% RC) de *Salmonella* Enteritidis 105 en presencia del SLC de *L. salivarius* 1231B (■), *L. salivarius* 1232Y (■), *L. salivarius* 1233C (■), *L. salivarius* 1234C (■) y *L. agilis* 1235C (■) crecidos en permeado de suero suplementado con extracto de levadura. SLC en concentración directa (C. Directa) y diluido (D 1/2, D 1/4, D 1/6 y D 1/10). Las barras verticales corresponden a la desviación estándar. Evaluación estadística: ANOVA de un solo factor, test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha = 0,05$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre diluciones del SLC en un mismo aislado ($p < 0,05$). Los límites establecidos de acuerdo a la clasificación del efecto inhibitorio se indican con líneas punteadas.

Los SLC de estos 5 aislados inhibieron fuertemente el desarrollo de *S. Enteritidis* 105, hasta diluidos 1/4, con porcentajes de reducción del crecimiento por encima del 70 % (con excepción de *L. salivarius* 1232Y, en el que se observó este efecto hasta la dilución 1/2). Para cada uno de los aislados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los efectos obtenidos a partir de los SLC, tanto en concentración directa como diluidos 1/2 y 1/4 (a excepción de *L. salivarius* 1232Y). El efecto inhibitorio fue de carácter medio para el SLC de todos los aislados en concentración 1/6, alcanzando valores de 53,4 % ($\pm 4,8$ %), 45,3 % ($\pm 1,9$ %), 40,5 % ($\pm 0,9$ %), 60,4 % ($\pm 1,1$ %) y 60,3 % ($\pm 1,5$ %) para 1231B, 1232Y, 1233C, 1234C y 1235C, respectivamente. El sobrenadante en concentración 1/10 obtuvo una baja inhibición del patógeno, con valores dentro del rango de 20 a 40 %.

En la **Tabla 16** se presenta la evaluación del efecto inhibitorio de los SLC y las diluciones ensayadas de cada aislado, respecto a si el efecto fue bactericida o bacteriostático.

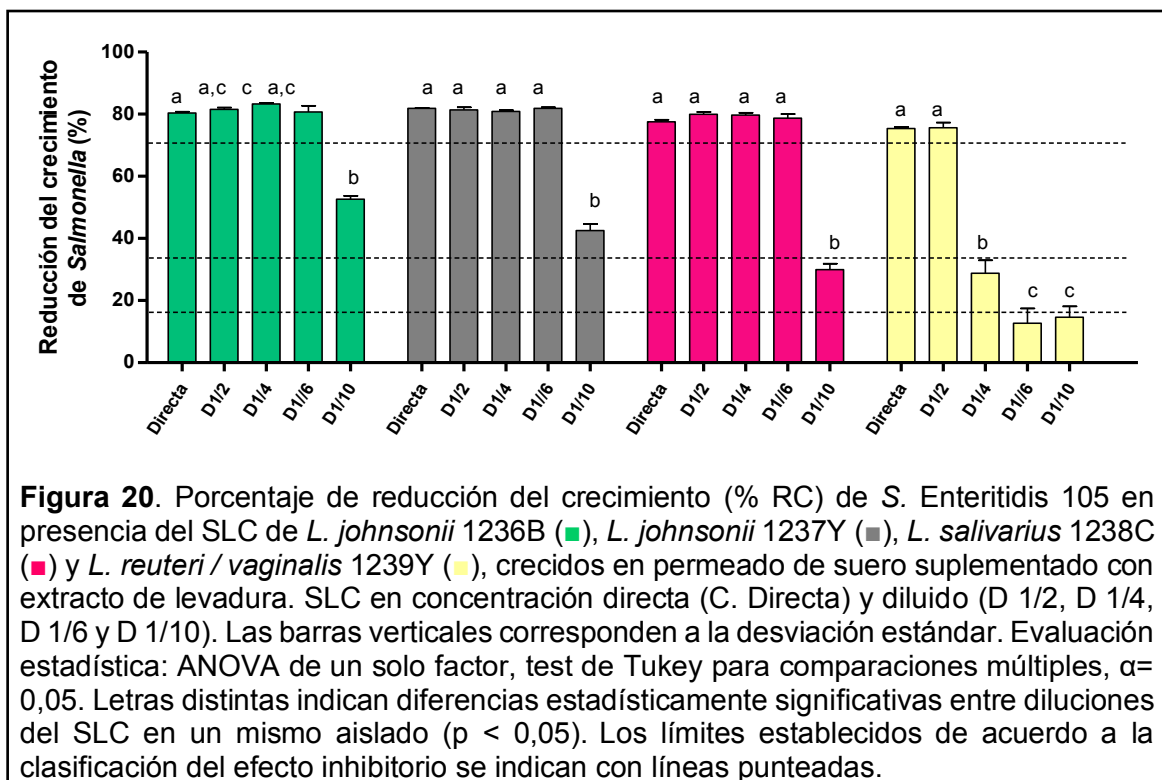
Tabla 16. Carácter del efecto inhibitorio frente a *S. Enteritidis* 105 de los SLC, tanto en concentración directa como diluidos, obtenidos a partir de la fermentación de los aislados *L. salivarius* 1231B, *L. salivarius* 1232Y, *L. salivarius* 1233C, *L. salivarius* 1234C y *L. agilis* 1235C en medio permeado de suero suplementado con extracto de levadura.

Aislado	pH	SLC				
		C. Directa	Dilución 1/2	Dilución 1/4	Dilución 1/6	Dilución 1/10
<i>L. salivarius</i> 1231B	3,1	-cida	-cida	-statico	-	-
<i>L. salivarius</i> 1232Y	4,0	-cida	-cida	-statico	-	-
<i>L. salivarius</i> 1233C	3,9	-cida	-cida	-statico	-	-
<i>L. salivarius</i> 1234C	3,7	-cida	-cida	-cida	-	-
<i>L. agilis</i> 1235C	3,1	-cida	-cida	-cida	-	-

Nota: las diluciones de los SLC que no evidenciaron, a simple vista, efecto inhibitorio no fueron evaluadas y se indican como (-).

Por lo que los SLC de estos 5 aislados, obtenidos a partir del crecimiento en medio permeado de suero suplementado con extracto de levadura, podrían utilizarse para generar un efecto bactericida en el desarrollo de *S. Enteritidis* 105, tanto en concentración directa como diluido 1/2. Adicionalmente, los SLC de *L. salivarius* 1234C y *L. agilis* 1235C podrían generar ese mismo efecto hasta diluidos 1/4.

En cuanto a la acción inhibitoria de los SLC de *L. johnsonii* 1236B, *L. johnsonii* 1237Y, *L. salivarius* 1238C y *L. reuteri* / *vaginalis* 1239Y (**Figura 20**), se observó un marcado efecto inhibitorio hasta en el caso de los SLC diluidos 1/6 para el caso de *L. johnsonii* 1236B, *L. johnsonii* 1237Y y *L. salivarius* 1238C, con porcentajes en el rango de 77,2 % ($\pm 0,7$ %) a 83,3 % ($\pm 0,2$ %). En el caso de *L. reuteri* / *vaginalis* 1239Y, se observó un alto porcentaje de inhibición con el SLC en concentración directa ($75,4 \pm 0,5$ %) y diluido 1/2 ($75,6 \pm 1,9$ %); luego, su efecto disminuyó al diluirse 1/4 ($28,8 \pm 4,2$ %), 1/6 ($12,7 \pm 4,7$ %) y 1/10 ($14,6 \pm 3,5$ %).



Adicionalmente, se evaluó si el efecto inhibitorio de estos SLC frente a *S. Enteritidis* 105 fue bacteriostático o bactericida (**Tabla 17**). Todos los SLC ejercieron efecto bactericida en concentración directa. Los SLC de *L. johnsonii* 1236B, *L. johnsonii* 1237Y y *L. salivarius* 1238C, diluidos hasta la concentración 1/4, presentaron efecto bactericida mientras que, en la dilución 1/6, demostraron carácter bacteriostático. Respecto al SLC de *L. reuteri / vaginalis* 1239Y, su acción fue bactericida sólo en concentración directa sin diluir, y bacteriostática diluidos 1/2; a mayores diluciones, no presentó efecto inhibitorio.

Tabla 17. Carácter del efecto inhibitorio frente a *S. Enteritidis* 105 de los SLC, tanto en concentración directa como diluidos, obtenidos a partir de la fermentación de *L. johnsonii* 1236B, *L. johnsonii* 1237Y, *L. salivarius* 1238C y *L. reuteri / vaginalis* 1239Y, en permeado de suero suplementado con extracto de levadura.

Aislado	pH	SLC				
		C. Directa	Dilución 1/2	Dilución 1/4	Dilución 1/6	Dilución 1/10
<i>L. johnsonii</i> 1236B	3,8	-cida	-cida	-cida	-statico	-
<i>L. johnsonii</i> 1237Y	3,8	-cida	-cida	-cida	-statico	-
<i>L. salivarius</i> 1238C	3,9	-cida	-cida	-cida	-statico	-
<i>L. reuteri / vaginalis</i> 1239Y	4,6	-cida	-statico	-	-	-

Nota: las diluciones de los SLC que no evidenciaron, a simple vista, efecto inhibitorio no fueron evaluadas y se indican como (-).

Diversos autores han evaluado el efecto de los SLC de bacterias lácticas frente a distintos patógenos. Chen et al. (2019) estudiaron la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) de los SLC de varios aislados de *L. plantarum*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus* frente *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Los resultados hallados respecto a la CIM (10 - 30 % del SLC) y a la CBM (20 - 40 % del SLC) frente a los patógenos mencionados fueron similares a los obtenidos en esta Tesis con el SLC frente a *E. coli* (**Tabla 15**), donde se determinó efecto bacteriostático con los SLC diluidos hasta 1/10 (equivalente al 10%) y, efecto bactericida, con los SLC diluidos 1/2 (equivalente al 50 %).

De acuerdo a la investigación de Arena et al. (2016), los SLC de diecisiete cepas de *L. plantarum* inhibieron de forma significativa el desarrollo de *Salmonella* Enteritidis a concentraciones mayores e iguales al 25 % v/v (equivalente a la dilución 1/4 realizada en esta Tesis) en medio líquido. El mayor efecto inhibitorio se obtuvo con el SLC de *L. plantarum* 30, el cual redujo en un 96 % (respecto al control); el resto de los SLC obtuvo porcentajes de inhibición mayores al 60 %, a excepción de *L. plantarum* 104, el cual produjo una inhibición menor al 50 %.

Se ha demostrado que ciertas cepas de *L. johnsonii* producen peróxido de hidrógeno y la presencia de este compuesto en el sobrenadante causa la inhibición de *Salmonella* (Pridmore et al., 2008). Por lo tanto, en el caso de los SLC de las cepas estudiadas en esta Tesis, la presencia de peróxido de hidrógeno podría contribuir al efecto de los ácidos en la inhibición de este patógeno.

En consonancia con la bibliografía expuesta, todos los SLC obtenidos a partir del crecimiento de los aislados en permeado de suero suplementado con extracto de levadura inhibieron el desarrollo de *S. Enteritidis* 105. En algunos casos, el efecto inhibitorio se mantuvo con el SLC diluido. Los metabolitos producidos por *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C, *L. salivarius* 1238C, *L. johnsonii* 1236B y *L. johnsonii* 1237Y demostraron tener un fuerte efecto inhibitorio frente al crecimiento de *Salmonella* 105, con acción bactericida hasta la dilución 1/4. Este resultado es importante ya que indica que el crecimiento de los aislados en medios diferentes al MRS, como el permeado de suero, permite obtener también SLC con metabolitos activos frente a patógenos comúnmente encontrados en las granjas avícolas. Estos sobrenadantes se podrían utilizar como biocontrol en el ambiente de manera segura y serían una alternativa a los compuestos químicos usados habitualmente.

Como conclusión de esta sección, se puede mencionar que todos los SLC (en concentración directa) de *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C, *L. plantarum* 83114, y *Enterococcus* sp. 1, *Enterococcus* sp. 2 y *Enterococcus* sp. 3, recolectados a partir del

crecimiento de los aislados en MRS comercial, fueron capaces de reducir, en más del 70 % (con acción bactericida), el desarrollo de cepas de *Salmonella* sp. y un aislado multirresistente de *E. coli*, ambos patógenos ampliamente presentes a lo largo de la cadena de producción aviar: *E. coli* como principal causante de disbacteriosis en los animales y *Salmonella* sp., donde *S. Enteritidis* es uno de los principales microorganismos responsable de las ETAs (Enfermedades Transmitidas por Alimentos) y *S. Gallinarum*, es un patógeno presente en producción aviar, que afecta principalmente a las aves. Inclusive, en ciertos casos, los SLC diluidos alcanzaron el mismo efecto que sin diluir. Además, dependiendo del patógeno que se quiera inhibir, se emplearán diferentes diluciones de los SLC para conseguir el efecto bactericida.

En cuanto al crecimiento de diferentes cepas de *Salmonella* en presencia del SLC de *Enterococcus* sp. 2, se observó que el efecto fue cepa dependiente: en algunos casos, el efecto bactericida se dio sólo con el SLC en concentración directa y, en otros casos, fue posible su dilución sin alterar su efecto. Además, se constató que los SLC obtenidos a partir del cultivo de los aislados en un medio diferente al medio MRS (permeado de suero suplementado con extracto de levadura), ejercieron efecto bactericida frente a *S. Enteritidis* 105, con porcentajes de reducción mayores al 70%, diluidos hasta 1/2 y, en algunos casos, tuvieron el mismo efecto a mayores diluciones.

2.3.3 Determinación de la composición de ácidos orgánicos de los sobrenadantes libres de células de los aislados

Los ácidos orgánicos, tales como el ácido láctico y el ácido acético, son metabolitos producidos por las bacterias lácticas a los cuales desde hace muchos años se les ha atribuido la función de conservantes de alimentos (El-Ghaish et al., 2011). Se ha propuesto que estos compuestos antimicrobianos inhiben el crecimiento de células bacterianas y fúngicas mediante diferentes mecanismos: la disrupción de la membrana plasmática (Stratford & Anslow, 1998; Bracey et al., 1998; Chen et al., 2014; Yarlagaadda et al., 2015), la inhibición de reacciones metabólicas esenciales (Krebs et al., 1983; Murima et al., 2014; Capasso & Supuran, 2015) y la generación de estrés celular para mantener el pH intracelular (Cole & Keenan, 1986; Salmond et al., 1984; Bracey et al., 1998; Cheng et al., 2015).

En el ámbito de la industria avícola, los ácidos orgánicos (acético, cítrico, láctico, málico, propiónico y tartárico, entre otros) son una buena alternativa para la prevención de brotes de *Salmonella*. Los mismos se han utilizado durante muchos años para la

decontaminación bacteriana de productos de carne de res, cerdo y aves de corral (Van Immerseel et al., 2006; Mani-Lopez et al., 2012; Khan & Iqbal, 2016).

A fin de complementar el estudio del efecto inhibitorio de los aislados frente a *Salmonella*, se evaluó la concentración de los ácidos orgánicos, específicamente de ácido láctico, ácido acético y ácido propiónico, presentes en los sobrenadantes libres de células (SLC) obtenidos a partir del cultivo en MRS y en permeado de suero suplementado con extracto de levadura de algunos de los aislados.

A partir de las soluciones patrones de ácido láctico, ácido acético y ácido propiónico, se obtuvieron las curvas de calibración para cada uno de ellos, de acuerdo a lo expuesto en la **Sección 1** del **Apéndice 2**, al igual que sus tiempos de retención en la columna de intercambio iónico. A partir del análisis de los cromatogramas de las muestras y empleando las curvas de calibración, se determinó la concentración de ácidos orgánicos. Para todas las muestras evaluadas, se obtuvieron picos con tiempos de retención coincidentes con los de los ácidos láctico y acético. Utilizando esta técnica, no fue posible determinar la presencia de ácido propiónico ya que no se detectaron picos con tiempos de retención coincidentes con el patrón de dicho ácido orgánico (**Tabla 18**).

Tabla 18. Concentración total de ácido láctico y ácido acético presentes en cultivos de los aislados crecidos en MRS y PS (5% p/v) suplementado con extracto de levadura (1 % p/v) a 37 °C por 24 horas. Los tiempos de retención fueron 10,512 min y 12,273 min minutos para el ácido láctico y ácido acético, respectivamente.

Muestras	pH	[Ácido láctico] ppm (g/l)	[Ácido acético] ppm (g/l)
PS +Extracto de Levadura	6	2.544,2 ± 312 (2,5 ± 0,3)	ND
<i>L. salivarius</i> 1234C	3,7	8.637,4 ± 671 (8,6 ± 0,6)	2.007,5 ± 190 (2,01 ± 0,1)
<i>L. agilis</i> 1235C	3,1	12.477,9 ± 2.590 (12,4 ± 2,5)	2.054,7 ± 190 (2,05 ± 0,1)
MRS	6,5	5.328,5 ± 809 (5,3 ± 0,8)	ND
<i>L. salivarius</i> 1231B	3,9	34.948,5 ± 2.639 (34,9 ± 2,6)	10.377,5 ± 3.140 (10,38 ± 3,1)
<i>L. salivarius</i> 1232Y	4,2	28.439,0 ± 1.849 (28,4 ± 1,8)	7.923,5 ± 127 (7,9 ± 0,1)
<i>L. salivarius</i> 1234C	4,0	23.274,5 ± 2.930 (23,2 ± 2,9)	12.293,5 ± 813 (12,2 ± 0,8)
<i>L. agilis</i> 1235C	3,8	26.020,0 ± 3.117 (26,0 ± 3,1)	6.701,5 ± 630 (6,7 ± 0,6)
<i>Enterococcus</i> sp. 2	4,0	28.599,0 ± 3.403 (28,5 ± 3,4)	9.270,0 ± 542 (9,2 ± 0,5)

Todos los SLC evaluados en esta sección fueron previamente utilizados en los estudios de inhibición frente a bacterias patógenas en este capítulo. Los SLC de *L. salivarius*

1231B y *L. salivarius* 1232Y (en medio MRS) fueron utilizados previamente en la evaluación del efecto de los cultivos completos y los SLC frente a *Salmonella enterica* in vitro (**Sección 2.3.1**). Aquellos obtenidos a partir de la fermentación de *L. salivarius* 1234C y *L. agilis* 1235C, tanto en permeado de suero suplementado como en medio MRS, se utilizaron en los ensayos de evaluación de la actividad inhibitoria de los SLC frente a *S. Enteritidis* 105 y *Escherichia coli* (**Sección 2.3.2**). Respecto al SLC de *Enterococcus* sp. 2 en MRS, se determinó su acción inhibitoria frente a diferentes cepas de *S. Enteritidis* (101, 105 y 106).

En base a diversas investigaciones, se ha determinado que *Lactobacillus* spp. es capaz de producir ácido láctico a partir de azúcares fermentables como lactosa, sacarosa, glucosa y fructosa (Srinivas et al., 1990; Vidra et al., 2017). La fermentación de los aislados en MRS y PS suplementado, produjo un aumento en la concentración de ácido láctico y la aparición de ácido acético en el SLC, respecto al medio base sin fermentar (**Tabla 18**).

Comparando los resultados de la fermentación con respecto al medio de cultivo utilizado, se observó que para *L. salivarius* 1234C, el pH final en PS suplementado fue menor respecto a la fermentación en MRS, pero la diferencia entre el valor inicial y el final fue similar para ambos medios ($\Delta\text{pH}_{\text{MRS}} = 2,48$; $\Delta\text{pH}_{\text{PS+lev}} = 2,26$); respecto a la concentración de los ácidos en general, fue superior en MRS en comparación con el PS suplementado. Una situación similar se observó en la fermentación de *L. agilis* 1235C. La diferencia de concentraciones de ácidos entre un medio y otro puede relacionarse directamente con la baja concentración de componentes fuente de nitrógeno en el PS y la riqueza nutricional del MRS, tema que fue discutido en el **Capítulo 1 (Sección 1.3.5 "Crecimiento en diferentes medios de cultivo")**. La mayoría de las bacterias ácido lácticas requieren de una fuente de nitrógeno (en forma de péptidos o aminoácidos) para el desarrollo microbiano (Manca de Nadra, 2007). Numerosos estudios han detectado la presencia de ácido láctico y ácido acético en los SLC obtenidos a partir del crecimiento de bacterias ácido lácticas. De acuerdo a Adetoye et al. (2018), se determinaron mediante HPLC las concentraciones de ácido láctico, acético y propiónico alcanzadas en una fermentación por 24 horas a 37 °C de diferentes especies de *Lactobacillus* en medio de cultivo MRS. La concentración de ácido láctico fue superior respecto a la de ácido acético para todas las especies estudiadas; y, en general, las concentraciones más bajas fueron las de ácido propiónico. *L. salivarius* C86 produjo la mayor concentración de ácido láctico de 67,85 g/l (alrededor del doble de la concentración alcanzada en este estudio), mientras que el valor más bajo se obtuvo con *L. ingluivie* C31, de 8,88 g/l. La concentración de ácido acético producida por los lactobacilos fue del orden de 10 g/l, similar a la concentración determinada para los aislados evaluados

en esta Tesis. Respecto al ácido propiónico, se informaron valores entre 2 y 5 g/l, con excepción de *L. ingluvie* C31, el cual obtuvo una concentración de 19 g/l.

Zalán et al. (2010) analizaron la fermentación (a 37 °C por 18 horas) de diferentes aislados de *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. paracasei* y *L. curvatus*) en medio MRS y determinaron una concentración de ácido láctico entre 36,03 g/l y 77,27 g/l, valores superiores a los encontrados en esta Tesis; sin embargo, la concentración determinada de ácido acético (9 g/l y 1,5 g/l) fue cercana al valor determinado en esta Tesis para algunos aislados.

Desniar et al. (2020) determinaron por HPLC que la mayor producción de ácido láctico en MRS, luego de 48 horas a 37 °C, a partir de aislados de *Pediococcus pentosaceus* y *L. plantarum* aislados de pescado fermentado indonés (bekasam) fue de 747,47 – 778,26 ppm, mientras que los mayores valores de ácido acético estuvieron entre 739,11 y 628,48 ppm. Estos datos se encuentran por debajo de los obtenidos para los aislados evaluados en este trabajo de Tesis.

Dosuky Atiat et al. (2019) evaluaron la fermentación (a 37 °C por 36 horas) de diferentes cepas de *Lactobacillus* (*L. bulgaricus*, *L. lactis* 48, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* B-445, *L. acidophilus* 791N y *L. casei* 761N) en un medio de cultivo formulado con permeado de suero (5 % p/v) y extracto de levadura (0,75 % p/v) (más sulfato de manganeso y carbonato de calcio). Mediante HPLC, hallaron que la concentración de ácido láctico obtenida fue especie dependiente, con valores dentro del rango 10,73-22,10 g/l. Para *L. salivarius* 1234C y *L. agilis* 1235C crecidos en permeado de suero suplementado con extracto de levadura, las concentraciones de ácido láctico fueron 8,64 g/l y 12,48 g/l, respectivamente, muy cercano a los valores hallados por Dosuky Atiat et al. (2019).

La obtención de ácido láctico a partir de la fermentación de *L. helveticus* en medio de cultivo formulado con permeado de suero (5,8 % p/v), extracto de levadura (0,2 % p/v) y fosfato inorgánico, en un período de tiempo de 25 horas a 42 °C, fue del orden de 40 g/l (Amrane, 2000), valor superior al obtenido en esta Tesis. Esta diferencia podría relacionarse con la temperatura de fermentación y la regulación del valor de pH mínimo de 5,9 durante toda la fermentación.

Teniendo en cuenta nuestros resultados y las investigaciones mencionadas se puede observar que la producción de ácidos, principalmente ácido láctico y ácido acético, por parte de las bacterias lácticas es muy variable y está regulada/condicionada por el medio de cultivo y los nutrientes presentes en el mismo. La mayor parte de los microorganismos son susceptibles a los efectos antimicrobianos de los ácidos orgánicos y tal inhibición aumenta por la reducción del pH del medio de cultivo (Conner et al., 1990; Alakomi et al., 2000; Ricke, 2003; Gómez-García et al, 2019). Este fenómeno de

inhibición es debido a la propiedad hidrofóbica de los ácidos orgánicos no disociados, lo que permite la difusión libre de la forma protonizada a través de la membrana celular. Este proceso de difusión se lleva a cabo espontáneamente debido a los gradientes de pH y osmolaridad que existen entre el interior y el exterior celular. En condiciones normales, el pH intracelular es mayor que el extracelular, por lo que el ácido se disocia tan pronto entra en el citoplasma celular, con el consiguiente descenso del pH intracelular mediante la liberación del protón. Para contrarrestar la disminución del pH citoplásmico celular, la célula invierte una gran cantidad de energía para eliminar estos protones, ralentizando el resto de sus funciones metabólicas indispensables para su crecimiento (Kihara & Macnab, 1981; Salmond et al., 1984; White et al., 1992).

La ionización de un ácido orgánico en el citoplasma ocurre de forma inmediata y es sistemáticamente equilibrada por diversos mecanismos de homeostasis de acuerdo a la bacteria (Booth, 1985; Slonczewski et al., 2009); pero en líneas generales, ocurrirá la exportación de un protón bajo el impulso de la fuerza promotora la cual se establece a nivel de la membrana celular. Cuando este sistema es continuamente activado, el sistema de regeneración de ATP se ve afectado como en el transporte activo de nutrientes en la célula (Sheu et al., 1975).

Además del metabolismo energético, son afectadas otras funciones celulares. Se demostró que la ocurrencia de perturbaciones en el transporte transmembrana de aminoácidos y que algunos cambios estructurales de las proteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidos y las perturbaciones en el sistema enzimático también pueden deberse al bombeo de protones contragradiante que ocurre en la célula (Freese et al., 1973; Eklund, 1980; Booth, 1985).

Considerando que el efecto antimicrobiano se debe fundamentalmente a la fracción no disociada, a continuación, se determinó la concentración de los ácidos sin disociar y el porcentaje en el que se encuentran respecto al total.

2.3.3.1 Cálculo de la concentración de ácidos orgánicos no disociados

La fracción no disociada de cada ácido débil depende del valor de pH del medio y del valor de la constante de disociación (pKa). El efecto antibacteriano y antifúngico aumenta a medida que el pH disminuye con respecto al pKa del ácido, donde se favorece la forma no disociada del mismo (León Peláez et al., 2012; Caro Velez & Peláez, 2015; Poppi et al., 2015). A fin de determinar la concentración efectiva de los ácidos con efecto inhibitorio frente a patógenos, se calcularon las concentraciones de ácidos no disociados (ND) al pH final de la fermentación.

A partir de las concentraciones de ácidos orgánicos determinadas en la sección anterior, se calculó la concentración teórica de ácidos no disociados en los SLC de acuerdo a la **Ecuación 6 (Sección 2.2.5.1)**. Los resultados se presentan en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Concentración teórica de ácidos acético y láctico no disociados ([HA]) en sobrenadantes obtenidos a partir de la fermentación de *L. salivarius* 1231B, *L. salivarius* 1232Y, *L. salivarius* 1234C y *L. agilis* 1235C en MRS y en permeado de suero suplementado con extracto de levadura (sólo 1234C y 1235C). Las concentraciones se expresan en ppm y en % de ácido no disociado respecto al total. Los medios base (sin fermentar) se destacan subrayados en la tabla.

Muestras	pH	Fracción no disociada de ácido láctico [ppm]	Porcentaje de ácido no disociado (%)	Fracción no disociada de ácido acético [ppm]	Porcentaje de ácido no disociado (%)
<u>PS + extracto de levadura</u>	6,0	-	-	-	-
<i>L. salivarius</i> 1234C	3,7	4.426,6	51,2	1.471,5	73,3
<i>L. agilis</i> 1235C	3,1	8.141,7	65,2	1.706,6	83,0
<u>MRS</u>	6,5				
<i>L. salivarius</i> 1231B	3,9	15.905,8	45,5	7.115,6	68,5
<i>L. salivarius</i> 1232Y	4,2	11.208,5	39,4	4.987,7	62,9
<i>L. salivarius</i> 1234C	4,0	10.304,8	44,2	8.295,7	67,4
<i>L. agilis</i> 1235C	3,8	12.554,8	48,2	4.750,6	70,8
<i>Enterococcus</i> sp. 2	4,0	12.662,2	44,2	6.255,4	67,4

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, el efecto antimicrobiano aumenta a medida que el pH del medio disminuye con respecto al pKa del ácido débil (**Ecuación 6**), ya que se favorece la forma no disociada del mismo.

Para el caso del ácido acético (pKa = 4,75) en PS suplementado, donde los valores finales de pH fueron 3,7 y 3,1, la forma no disociada se encontró en un alto porcentaje (73 % y 83 %) respecto al total del ácido, un comportamiento similar encontrado en el medio MRS, donde los valores finales de pH fueron levemente superiores (3,9, 4,2, 4,0 y 3,8) y los porcentajes de ácidos no disociados respecto al total estuvieron en el rango entre 63 % y 70 %. Las concentraciones de ácido acético disociado (en ppm) fueron superiores en medio MRS respecto a PS suplementado debido a que la concentración total de ácido acético fue mayor (**Tabla 18**).

Respecto al ácido láctico en el medio MRS, los porcentajes de ácido no disociado se hallaron en el rango de 39 % a 48 %, mientras que, en permeado de suero

suplementado, los valores fueron más dispares: 16 % para 1234C y 65 % para 1235C. Pero para el ácido acético, como la concentración total de ácido láctico fue mayor en MRS (**Tabla 18**), se obtuvieron mayores concentraciones del ácido no disociado.

Se comparó la composición de ácidos débiles no disociados de los SLC de *L. salivarius* 1234C y *L. agilis* 1235C crecidos en permeado de suero suplementado con extracto de levadura teniendo en cuenta el efecto sobre el crecimiento del aislado de *S. Enteritidis* 105 (**Sección 2.3.2**). Aunque la concentración de ácido acético no disociado fue similar en ambos SLC (1.471 ppm y 1.706 ppm) y la de ácido láctico no disociado fue, aproximadamente, el doble en el SLC de *L. agilis* 1235C (8.141,7 ppm) respecto al SLC de *L. salivarius* 1234C (4.426 ppm), el efecto inhibitorio alcanzado fue el mismo (acción bactericida hasta la dilución 1/4). Respecto a los sobrenadantes de los mismos lactobacilos, pero crecidos en MRS, se halló acción bactericida hasta en la dilución 1/2 frente a *E. coli*; en este caso, la cantidad de ácido acético no disociado en el SLC de *L. salivarius* 1234C (8.295 ppm) fue mayor respecto a la encontrada en el SLC de *L. agilis* 1235C (4.750 ppm), mientras que la de ácido láctico fue 10.304 ppm y 12.554 ppm, respectivamente. Estos nos indicaría que no es posible relacionar de forma directa el efecto inhibitorio con la concentración total de ácidos orgánicos débiles ni con la prevalencia de uno respecto al otro, sino que entran en juego otros mecanismos de acción que involucran la relación sinérgica existente entre los dos ácidos (Adams & Hall, 1988; Dickson & Maynard, 1992; Rubin, 1978).

Respecto al SLC de *Enterococcus* sp. 2 en MRS, los valores de ácido láctico y ácido acético no disociados fueron similares a los obtenidos para el resto de los aislados en el medio de cultivo MRS. La fracción no disociada de ácido láctico y ácido acético fue de 12.662, 27 ppm (el 44,28 % del total de ácido láctico) y 6.255,44 ppm (67,48 % del total de ácido acético), respectivamente, y su presencia se podría relacionar, al igual que para los *Lactobacillus* sp., con su efecto inhibitorio frente al desarrollo de distintas cepas de *Salmonella* (*S. Enteritidis* 101, 105 y 106) (**Sección 2.3.2**).

De acuerdo a la **Sección 2.3.1**, al neutralizar el SLC de *L. salivarius* 1231B, el poder inhibitorio fue menor respecto al SLC sin neutralizar. Teniendo en cuenta la concentración total de ácidos orgánicos determinada por HPLC (**Tabla 18**) y el valor de pH (7), se pudo estimar la concentración de la fracción no disociada de ácido láctico y acético en el SLC neutralizado, las cuales fueron 1.355,69 ppm y 989,49 ppm, respectivamente. Estos valores se encuentran por debajo de las concentraciones de estos ácidos no disociados en el SLC sin neutralizar (15.905,8 ppm de ácido láctico y 7.115,6 ppm de ácido acético) (**Tabla 19**), comprobándose la hipótesis de que los metabolitos presentes en el SLC, principalmente los ácidos orgánicos débiles (en su

forma no disociada), son los responsables primarios de la acción inhibitoria frente a *S. Enteritidis* 105.

2.3.4 Efecto de los lactobacilos sobre la asociación e invasión de *Salmonella* a células Caco-2/TC-7

Varios estudios indican que las bacterias ácido lácticas podrían evitar la unión de los microorganismos patógenos, reduciendo la colonización y previniendo la infección (Chauvière et al., 1992; Coconnier et al., 1993, 2000; Servin, 2004; Zárate & Nader-Macias, 2006, Candela et al., 2008; Tuo et al., 2018) a través de la capacidad que tienen determinadas especies de *Lactobacillus* de adherirse a la superficie (Tuo et al.; 2013; Arai et al., 2016), compitiendo de esta manera con *Salmonella* por los sitios de unión al epitelio intestinal (Jankowska et al., 2008; Potočnjak et al, 2017).

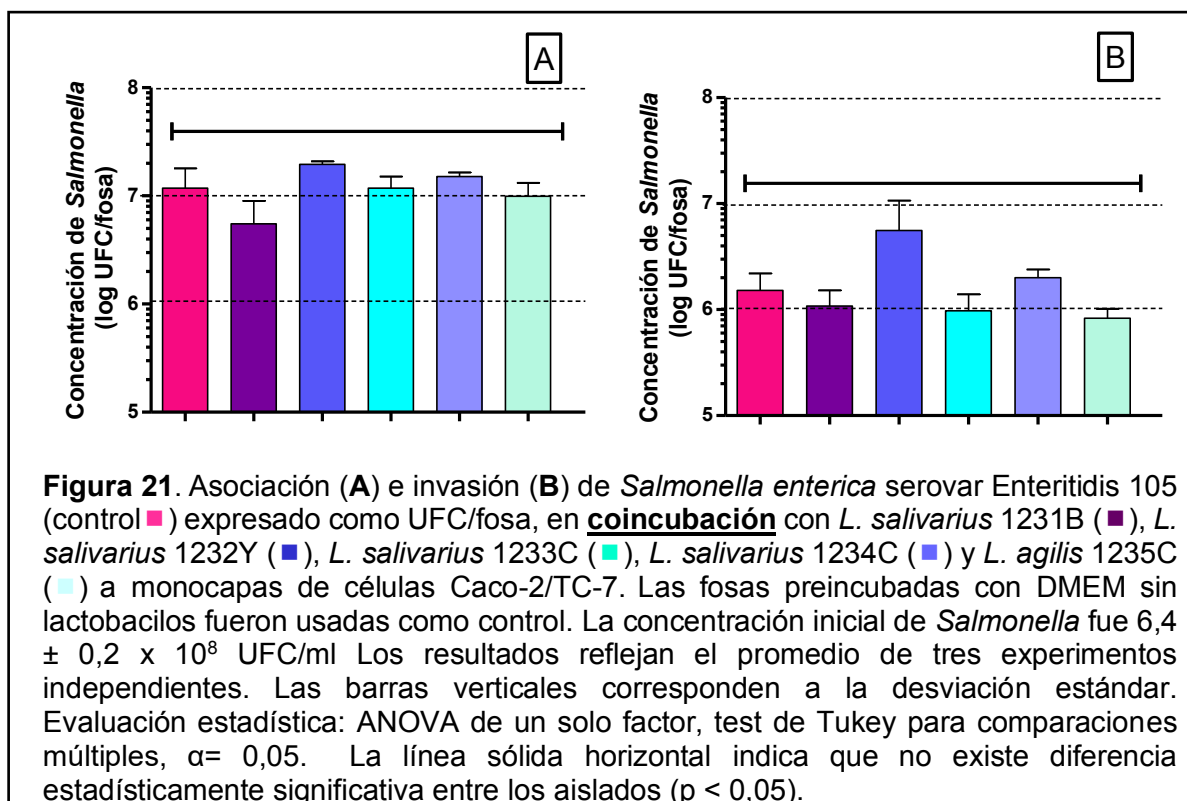
En la **Sección 1.3.4 del Capítulo 1**, se evaluó la capacidad de adhesión de los aislados a células Caco-2/TC-7, obteniendo porcentajes de adhesión entre 0,2 y 2 %. Teniendo en cuenta esos resultados, en esta sección se evaluó si estos aislados tienen la capacidad de modificar la adhesión/invasión de *Salmonella* sobre células intestinales *in vitro*.

La adhesión a las células epiteliales es un proceso clave para que las bacterias puedan sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal (TGI). En el caso de bacterias patógenas, como *Salmonella*, la adhesión al epitelio es un paso crítico ya que permite la liberación de enzimas y toxinas iniciando procesos necróticos directamente en la célula objetivo y facilitando la invasión (Stecher et al., 2007; Ribet & Cossart, 2015).

Uno de los mecanismos por los cuales las células del TGI están protegidas de las infecciones por microorganismos patógenos es a través de la competencia de la microbiota por sitios de adhesión y producción de componentes con actividad antimicrobiana (Ouwehand & Vesterlund, 2003; Baccigalupi et al., 2005). En el caso de *Salmonella*, el paso inicial de adhesión es mediado por fimbrias bacterianas que reconocen ciertos receptores en células eucariotas (Lehto & Salminen, 1997). Este patógeno posee múltiples componentes celulares externos, como flagelos, fimbrias y pili, que desempeñan un papel fundamental en el proceso de adhesión de las células a las superficies, la persistencia ambiental, la formación de biofilm y la colonización e invasión celular (Gibson et al., 2007; Wagner & Hensel, 2011; Steenackers et al., 2012). En esta parte del trabajo, se evaluó si la presencia de las bacterias ácido lácticas aisladas afectaban los procesos de asociación e invasión de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis a la monocapa de células Caco-2/TC-7. También se evaluó la cepa

L. kefir CIDCA 8321, la cual ha sido caracterizada por el grupo de trabajo (Garrote et al., 2001; Golowzyc et al., 2007) y se ha estudiado su capacidad de adhesión al epitelio intestinal *in vitro*.

En una primera parte, se evaluó el efecto de la **coincubación** entre *Salmonella* y los lactobacilos en la monocapa sobre los procesos de asociación e invasión celular del patógeno, de acuerdo a lo detallado en la **Sección 2.2.6.a**. Los resultados se expresaron como la concentración de *Salmonella* (log UFC/fosa) (**Figura 21**).

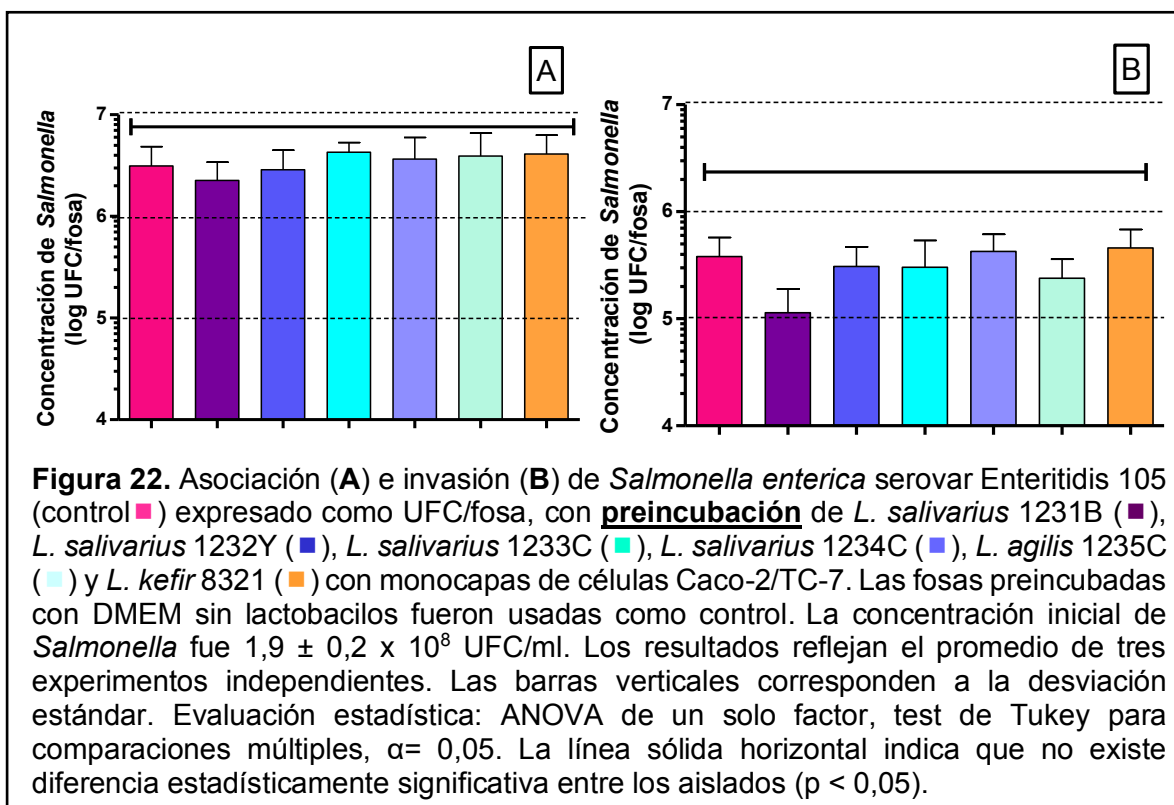


De acuerdo a lo observado en la **Figura 21**, la coincubación de los aislados con *Salmonella* no demostró diferencias significativas en los procesos de asociación e invasión del patógeno a la monocapa celular.

Otra forma de expresar los resultados fue, a partir de la **Ecuación 7** y la **Ecuación 8**, determinando los porcentajes de asociación e invasión relativos. *L. salivarius* 1231B obtuvo porcentajes de asociación e invasión relativos de 38 % y 94 %, respectivamente; mientras que los porcentajes del resto de los aislados fueron del 100%, tanto para la asociación como invasión relativos. En ninguno de los casos se obtuvieron diferencias significativas entre los aislados.

En una segunda parte, se evaluó el efecto de la **preincubación** de la monocapa celular con los lactobacilos sobre los procesos de asociación e invasión celular de *Salmonella*,

de acuerdo a lo detallado en la **Sección 2.2.6.b**. Los resultados se expresaron como la concentración de *Salmonella* (UFC/fosa) (**Figura 22**).



Los resultados obtenidos en las **Figuras 22** demuestran que la preincubación de los lactobacilos con las células no modifica la asociación/invasión del patógeno de forma significativa.

De acuerdo a las **Ecuación 7** y la **Ecuación 8**, expresando los resultados como porcentajes de asociación e invasión relativos, *L. salivarius* 1231B obtuvo porcentajes de asociación e invasión relativos de 79 % y 53 %, respectivamente. Los porcentajes de asociación del resto de los aislados se encontraron en el rango de 92 % a 94 %, mientras que los valores de invasión fueron entre el 76 % y el 82 %. En ninguno de los casos se obtuvieron diferencias significativas entre los aislados.

Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, los lactobacilos no lograron un efecto inhibitorio frente a la asociación e invasión de *Salmonella*. Estos resultados coincidieron con el trabajo de Feng et al. (2016), en el cual se evaluó el efecto sobre la adhesión e invasión de *Salmonella* Enteritidis a células Caco-2 en presencia de seis cepas probióticas del género *Lactobacillus* aisladas de contenido intestinal de gallinas, las cuales fueron pre-incubadas con la monocapa. En general y para todos los probióticos, la mayor inhibición se obtuvo en la etapa de invasión. Estos autores demostraron que la cepa *L. plantarum* PZ01 fue la que produjo mayor inhibición en

cuanto a la adhesión e invasión del patógeno con porcentajes relativos del 30 y 5%, respectivamente, donde el valor del 100% correspondía al control (*Salmonella* en ausencia de microorganismos probióticos). En cuanto a los aislados de *L. salivarius*, los porcentajes relativos de adhesión e invasión fueron 65% y 30%, y 90 y 75% para *L. salivarius* JM 32 y JK22, respectivamente. Estos valores concuerdan con los obtenidos en esta Tesis, donde los aislados de *L. salivarius* alcanzaron porcentajes relativos de asociación e invasión en el rango de 79 - 94 % y 53 - 83 %, respectivamente.

Jamyuang et al. (2019) hallaron que cepas de *L. plantarum* y *L. pentosus*, aisladas de leche materna humana, poseían actividad inhibitoria frente a la adhesión de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium a células Caco-2, protegiendo la monocapa celular en ensayos de preincubación, competencia (coincubación) y desplazamiento del patógeno, con porcentajes de inhibición de la adhesión en los rangos del 30 – 40 %, 22 – 27 % y 14 – 19 %, respectivamente.

Los resultados hallados por Nantavisai et al. (2018) establecieron que *L. salivarius* MSMC105-3, aislada de material fecal de neonatos, fue capaz de reducir los niveles de adhesión a células Caco-2 de dos cepas de *Salmonella* (*S. Typhi* y *S. dysenteriae*), principalmente en los ensayos de exclusión (preincubación del lactobacilo con la monocapa) y, en menor medida, de competencia (coincubación del lactobacilo, el patógeno y la monocapa); específicamente, redujo 10 y 5 veces la adhesión a Caco-2 en los ensayos de exclusión de *S. Typhi* y *S. dysenteriae*, respectivamente; y 3 y 1,5 veces para *S. Typhi* y *S. dysenteriae* en el ensayo de competencia, respectivamente. Por el contrario, el lactobacilo no mostró actividad en la reducción de la adhesión de las cepas patógenas en el ensayo de desplazamiento (preincubación de *Salmonella* con la monocapa).

Los resultados obtenidos por Potočnjak et al. (2017) demostraron que cepas de *L. plantarum*, de distintos orígenes, interfirieron en la adhesión a Caco-2 de una cepa de *Salmonella* Typhimurium, tanto en los ensayos de competición como de exclusión. La concentración del patógeno adherido en presencia de los lactobacilos fue significativamente más baja luego del pretratamiento (aproximadamente, 10^4 UFC/fosa) y de la incubación conjunta (aproximadamente, 10^3 UFC/fosa), en comparación con la ausencia de lactobacilos (aproximadamente, 10^5 UFC/fosa). De acuerdo a la hipótesis de los autores, estos resultados podrían deberse a que *L. plantarum* posee un mecanismo de adhesión tipo receptor similar al que utiliza *Salmonella*, por lo que su presencia disminuiría la probabilidad de adhesión del patógeno.

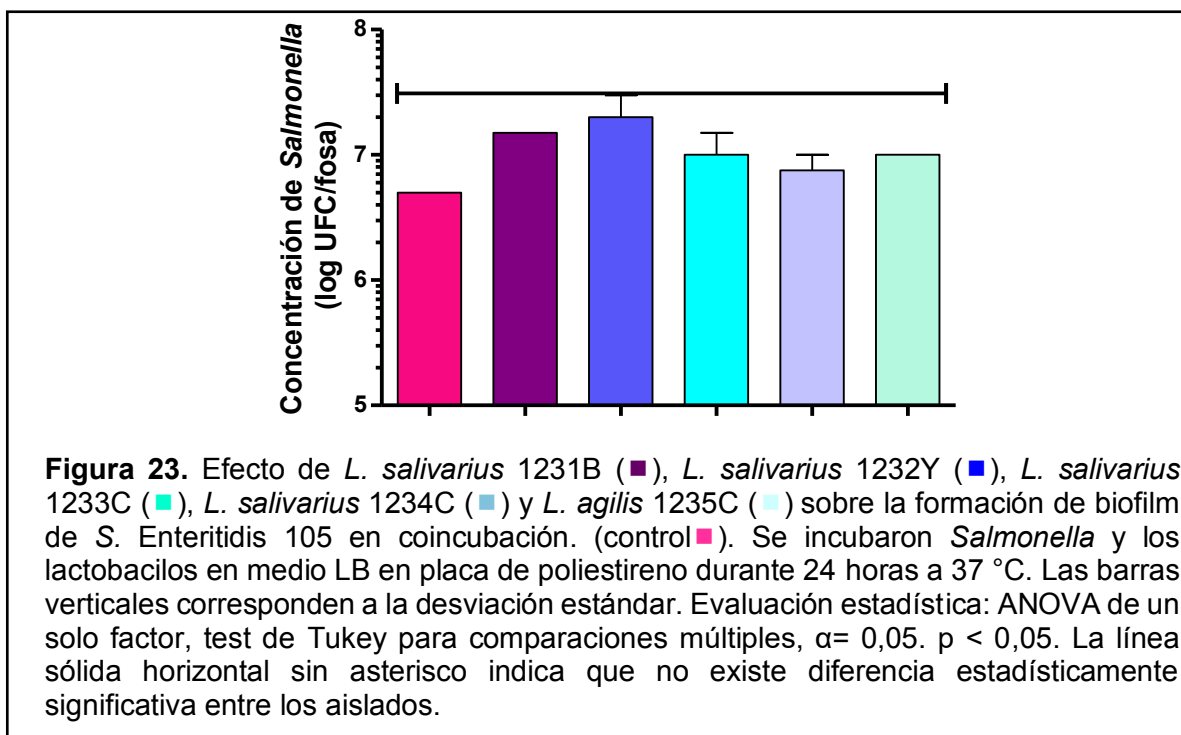
Aunque los aislados evaluados no fueron capaces de inhibir significativamente la asociación e invasión de esta cepa de *Salmonella* a una línea celular *in vitro*, hay que tener en cuenta que estos resultados son de tipo exploratorios, de manera que, los

ensayos *in vivo* son una instancia indispensable para poder obtener resultados concluyentes.

2.3.5 Efecto de los lactobacilos sobre la formación de biofilm de *Salmonella*

La formación de biofilm es un mecanismo de virulencia utilizado por *Salmonella* spp. para subsistir a cambios físicos y químicos del entorno. Esto contribuye a su resistencia y persistencia tanto en el huésped como en otros medioambientes, especialmente en las plantas procesadoras de alimentos, pudiendo formar biofilms tanto en superficies bióticas como abióticas (Steenackers *et al.*, 2011). Se han estudiado diversas estrategias para evitar la interacción entre *Salmonella* y las superficies propensas a ser sustrato de biofilm, entre las que se mencionan el uso de enzimas, terapia con fagos, extractos de plantas aromáticas, nanomateriales, inhibidores de detección del *quorum sensing*, bacteriocinas y bacterias ácido lácticas (Coughlan *et al.*, 2016; Merino *et al.*, 2019). Estas últimas, debido a su capacidad de producir componentes antimicrobianos, ofrecen una alternativa a los desinfectantes y antibióticos para la prevención y el control de los patógenos transmitidos por los alimentos (Marianelli *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2018). Recientes trabajos han demostrado que las bacterias ácido lácticas (LAB) pueden reducir la adhesión, colonización y formación de biofilm de patógenos a través de la competencia por los sitios de unión al sustrato y los nutrientes disponibles, así como también por la producción de metabolitos como ácidos orgánicos y biosurfactantes y por diversos mecanismos asociados a propiedades de superficie, como la coagregación (Collado *et al.*, 2007; Tahmourespour & Kermanshahi, 2011; Das *et al.*, 2013; Woo & Ahn, 2013; Chapman *et al.*, 2014; García-Cayueta *et al.*, 2014; Gómez *et al.*, 2016).

En esta parte del trabajo se estudió si los lactobacilos aislados y caracterizados previamente eran capaces de interferir en la formación de biofilm de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis 105 mediante estudios de coincubación en placas de poliestireno. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 23** de acuerdo a la técnica de cuantificación por recuento microbiológico en placa.



De acuerdo a lo observado en las **Figura 23**, los lactobacilos no interfirieron de forma significativa en el proceso de formación de biofilm de la cepa *S. Enteritidis* 105. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el medio de cultivo utilizado para la coincubación fue caldo LB, el cual es el adecuado para el crecimiento de *Salmonella*, pero no para los lactobacilos. Investigaciones previas en nuestro grupo de trabajo han demostrado que ciertos lactobacilos aislados de kefir tienen la capacidad de disminuir la formación de biofilm por parte de *Salmonella* (Merino, Tesis Doctoral 2019, Merino et al., 2019) y esta inhibición ocurrió cuando ambos microorganismos se incubaban juntos en el medio BHI (Brain Heart Infusion), medio en el que ambos son capaces de crecer. De esta manera sería interesante poder estudiar la interferencia de los microorganismos aislados en este trabajo en la formación de biofilm de *Salmonella* utilizando medio BHI donde ambos microorganismos puedan crecer durante la coincubación. Sumado a esto, Merino et al. (2019) han observado que ciertos metabolitos presentes en el sobrenadante de cultivo de estos lactobacilos contribuían a la inhibición del biofilm.

Por lo tanto, se necesita profundizar en estos estudios tanto con los lactobacilos aislados como con sus sobrenadantes de cultivo a fin de determinar el efecto sobre la producción de biofilm de *Salmonella*.

2.4 Conclusiones

A lo largo de este capítulo, se han utilizado diversas técnicas para evaluar la capacidad inhibitoria de los aislados bacterianos frente a cepas patógenas comúnmente encontradas en granjas avícolas como son *Salmonella* y *E. coli*. Se estudió el efecto tanto del cultivo fermentado completo como de sus partes por separado: la fracción microbiana y el SLC.

L. salivarius 1231B, *L. salivarius* 1232Y y *L. salivarius* 1234C fueron los aislados con mayor acción inhibitoria *in vitro* frente a *S. Enteritidis* 105 durante la coincubación en medio líquido. Tanto la fracción microbiana como los metabolitos presentes en los SLC contribuyeron a alcanzar un efecto inhibitorio significativo en menos de 6 horas de incubación a 37 °C.

Se constató el fuerte carácter inhibitorio de todos los SLC obtenidos a partir del crecimiento de los aislados, tanto en medio MRS como en medio permeado de suero suplementado con extracto de levadura, frente al desarrollo de diferentes bacterias patógenas. En el caso de los sobrenadantes de los cultivos en MRS, el efecto inhibitorio frente a *E. coli* fue de carácter bactericida hasta dilución 1/2, al igual que para el caso de *S. Gallinarum* 111 donde, con ciertos aislados, este efecto se extendió hasta la dilución 1/4. También se determinó que el efecto del SLC de *Enterococcus* sp. 2 frente a *S. Enteritidis* fue cepa dependiente: en el caso de algunas cepas de *Salmonella*, el efecto bactericida se dio sólo con el SLC en concentración directa y, en otros casos, fue posible su dilución sin alterar su efecto. Respecto a los SLC obtenidos a partir del cultivo de los aislados en permeado de suero con extracto de levadura, se determinó un efecto inhibitorio frente al crecimiento de *S. Enteritidis* 105, el cual se mantuvo con el SLC diluido hasta 4 veces. El conjunto de estos resultados indica que los SLC de los aislados poseen metabolitos con acción bactericida contra las bacterias patógenas evaluadas; pero, para ampliar el campo de acción, restaría evaluar el efecto frente a un número más amplio de cepas de diferentes serovares de *Salmonella*.

De modo complementario, utilizando HPLC, se determinó la concentración de ácidos orgánicos débiles (ácido láctico y ácido acético) en los SLC obtenidos a partir del crecimiento de algunos aislados, tanto en permeado de suero suplementado con extracto de levadura como en el medio MRS. La diferencia en cuanto a la concentración de cada ácido orgánico presente y su relación, en referencia al efecto sinérgico que existe entre los dos ácidos, podría ser la razón por la cual la actividad antimicrobiana varía entre especies.

En cuanto al efecto de la fracción microbiana, los lactobacilos evaluados no fueron capaces de inhibir significativamente la asociación e invasión de *S. Enteritidis* 105 a la línea celular Caco-2/TC-7 ni de inhibir el proceso de formación de biofilm en coincubación en las condiciones evaluadas. El efecto inhibitorio podría ser diferente si se modificaran las concentraciones tanto de las células como de *Salmonella*; esto podría inferirse de acuerdo a la bibliografía expuesta en la tesis, donde al variar ambas concentraciones, se observan diferentes resultados (Londero et al., 2014; Feng et al., 2016; Potočnjak et al., 2017; Nantavisai et al., 2018; Jamyuang et al., 2019).

CAPÍTULO 3

**Selección de aislados para
formular el producto probiótico y
su evaluación en pollos**

3.1 Objetivos

-Seleccionar los aislados que conformarán el producto probiótico teniendo en cuenta características de crecimiento y tecnológicas.

-Evaluar la inocuidad y mejoras en los parámetros productivos de la fracción microbiana del producto probiótico formulado, administrada a pollos, durante un ciclo completo de producción.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Las condiciones de crecimiento y los medios de cultivo utilizados para los lactobacilos aislados a partir del TGI de pollos y la cepa *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 fueron detalladas en la **Sección 2.2.1** del **Capítulo 2**, al igual que la obtención de sus sobrenadantes libres de células (SLC).

3.2.2 Selección de aislados para el ensayo *in vivo*

Se evaluaron algunas características de crecimiento y tecnológicas de importancia para la producción a gran escala.

3.2.2.1 Crecimiento en MRS suplementado con permeado de suero

A partir de permeado de suero deshidratado (PS) (Arla Food) y MRS comercial (Biokar), se preparó una solución de cada uno por separado, en concentración 5 % p/v, y luego se mezclaron (1:1) para formular el medio de cultivo. La esterilización del medio se realizó en autoclave, a 121°C durante 15 minutos.

Se partió de un cultivo microbiano en fase estacionaria, el cual fue inoculado al 1 % v/v en el medio de cultivo y se incubó a 37 °C. Se tomaron alícuotas del cultivo a diferentes tiempos para determinar la concentración microbiana. Se hicieron diluciones seriadas y recuentos en placas de agar MRS. El pH se determinó utilizando un pHímetro (Altronix®).

3.2.2.2 Viabilidad durante el almacenamiento a temperatura de refrigeración

Se evaluó la viabilidad del pellet bacteriano almacenado a temperatura de refrigeración (4 °C) durante 3 semanas. A partir de 10 ml de cultivo en fase estacionaria de cada aislado, se realizó una centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y la fracción microbiana (pellet) se almacenó a 4 °C, sin el agregado de una sustancia crioprotectora. Semanalmente, se tomaron muestras representativas de cada aislado, se realizaron diluciones en solución salina estéril y recuento en agar MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia). La evaluación se realizó durante un período de almacenamiento máximo de 3 semanas.

3.2.3 Selección y caracterización de los aislados seleccionados para formular el producto probiótico

3.2.3.1 Crecimiento en MRS formulado a partir de cada componente

Los componentes para formular el medio MRS fueron provistos por NITRAP SRL y el medio se preparó de acuerdo a la formulación utilizada por el personal de laboratorio de dicha empresa.

Se partió de un cultivo microbiano en fase estacionaria, el cual fue inoculado al 1 % v/v en el medio de cultivo y se incubó a 37 °C. Se tomaron alícuotas del cultivo a diferentes tiempos para determinar la concentración microbiana. Se hicieron diluciones seriadas y recuentos en placas de agar MRS. El pH se determinó utilizando un pHímetro (Altronix®).

Adicionalmente, se realizaron curvas de crecimiento y cinéticas de acidificación en el medio MRS. Utilizando un espectrofotómetro (modelo Helios Beta, Thermo Scientific®) y empleando cubetas de 1 cm camino óptico, se realizaron medidas de DO a 620 - 600 nm, a diferentes tiempos, hasta alcanzar la fase estacionaria. Como blanco de la medida, se utilizó el medio de cultivo sin inocular.

3.2.3.2 Viabilidad durante el almacenamiento a temperatura de congelación

Se evaluó la viabilidad del pellet bacteriano almacenado a temperatura de congelación (- 20 °C) durante 3 semanas. A partir de un cultivo en fase estacionaria de cada aislado, se realizó una centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y la fracción microbiana (pellet) se almacenó a - 20 °C, utilizando leche estéril como crioprotector. Semanalmente, se tomaron muestras representativas de cada aislado, se realizaron diluciones en solución salina estéril y recuento en agar MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia). La evaluación se realizó durante un período de almacenamiento de 3 semanas.

3.2.3.3 Estabilidad durante ciclos consecutivos de congelación/descongelación

Se evaluó la viabilidad de los aislados durante 4 ciclos consecutivos de congelación y descongelación. A partir de un cultivo en fase estacionaria, se realizó una centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y la fracción microbiana

(pellet) se almacenó a - 20 °C, utilizando leche estéril como crioprotector. Cada 48 horas, se descongeló completamente a temperatura ambiente, y la concentración bacteriana se determinó por medio de diluciones seriadas en solución salina estéril y siembra en agar MRS.

3.2.4 Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos son el promedio de experimentos realizados por duplicado o triplicado. Se presentan como los valores medios y sus correspondientes desviaciones estándar (DE). Todos los parámetros se analizaron con el programa estadístico GraphPadPrism versión 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California). Se consideraron diferencias significativas los valores de $p < 0,05$. Las diferencias significativas entre promedios se calcularon por ANOVA de un solo factor o de dos factores, seguido de test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha = 0,05$).

3.2.5 Administración del producto probiótico a pollos parrilleros

Se estudió el carácter inocuo del producto probiótico. Para ello, los animales fueron divididos en grupos y se les fueron administradas diferentes concentraciones del producto a lo largo de un ciclo de crianza completo (aproximadamente, 45 días). Se realizaron 2 ensayos en diferentes meses del año 2018: el primero se llevó a cabo entre Marzo y Abril y, el segundo, entre Mayo y Junio.

La vía de administración elegida para suministrar el probiótico fue el agua de bebida. El agua utilizada fue agua de red, desinfectada por cloración, la cual fue la misma que consumieron los animales del galpón. Adicionalmente, en el laboratorio, se constató la supervivencia de los aislados en una muestra de dicha agua.

Los ensayos fueron realizados de acuerdo al protocolo experimental N° 010-01-15, el cual fue avalado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (ver **Anexo 3**).

3.2.5.1 Preparación del producto probiótico

Cada aislado integrante del producto probiótico se cultivó de forma separada. Todos los cultivos se incubaron a 37 °C en aerobiosis hasta alcanzar el máximo tiempo de

cosecha, momento en el cual fueron centrifugados a 2.900 rpm por 15 minutos. Los sobrenadantes se descartaron y los pellets fueron suspendidos en leche entera estéril para criopreservarlos a - 20 °C. Para conformar el producto probiótico, se colocaron los cultivos individuales, en igual relación, en los tubos falcon (**Figura 24**), los cuales fueron marcados con distintos colores para facilitar su identificación y manejo. La concentración microbiana de cada tubo se preparó teniendo en cuenta el volumen de los bebederos y la concentración del probiótico establecida para los ensayos. Cada tubo falcon se preparó listo para diluir en un 1 litro de agua potable, desinfectada por cloración (**Figura 25**). Para el caso del grupo control, se fraccionó la misma cantidad de leche estéril para disolver en el agua de bebida.



Figura 24. Producto probiótico preparado en tubos falcon, listos para ser diluidos en el agua de bebida.

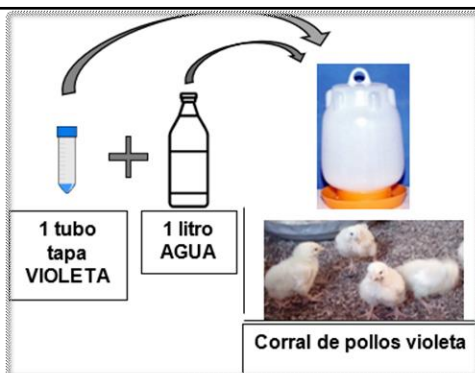


Figura 25. Esquema de la preparación del agua de bebida en los bebederos.

Los ensayos se desarrollaron en una granja avícola en la localidad de Olivera, perteneciente al Partido de Luján, provincia de Buenos Aires. Los productos probióticos fueron trasladados en conservadoras con refrigerantes hasta el lugar donde se realizó el ensayo *in vivo*. Allí se conservaron a temperaturas de congelación hasta su uso.

3.2.5.2 Animales empleados y condiciones de crianza

Se emplearon pollos de la línea Cobb, variedad Broiler (“parrilleros”), la cual es una raza desarrollada especialmente para la producción de carne debido a su rápido desarrollo y engorde.

El experimento se inició con un total de 30 animales por grupo, teniendo en cuenta los pesos, para disminuir la variación inicial. La presencia de machos y hembras en cada grupo quedó al azar ya que no se realizó el sexado de los animales.

Los animales fueron dispuestos en un sector del galpón cercano a la entrada y separados del resto de la producción por medio de una cortina plástica.

Los pollos parrilleros de 1 día de edad fueron pesados y distribuidos en lotes de promedio y varianza homogénea, descartándose aquellos cuyos pesos se encontraban en los extremos de la distribución. Fueron alojados en corrales realizados con redes de plástico y planchas de fibrofácil en pisos compuestos, principalmente, de cascarilla de girasol y arroz. La calefacción de los corrales se realizó con lámparas infrarrojas colgadas sobre los mismos.

Se les administró agua (mediante dos bebederos de piso por corral hacia el final del ciclo de crianza) y alimento *ad libitum*, excepto en los días de pesaje en los que se les privó de alimento por un período de 1 hora antes de pesarlos. Los animales fueron alimentados con alimento balanceado de diferente composición, de acuerdo a la edad: preiniciador, iniciador, terminador y retiro.

3.2.5.3 Sacrificios y toma de muestra

Se realizaron tres sacrificios durante todo el ciclo de crianza, utilizando la técnica de dislocación cervical. Los días seleccionados para llevar a cabo los sacrificios coincidieron con los cambios en la composición del alimento (pre-iniciador día 16, iniciador día 30 y terminador día 43, aproximadamente). Por cada día, se sacrificaron 4 animales por tratamiento/grupo y se realizaron las necropsias en condiciones de esterilidad. Se extrajo hígado, bazo, bolsa de Fabricio e intestino delgado (duodeno) (**Figura 26A**). Las extracciones se realizaron utilizando mecheros para garantizar la esterilidad en la zona y los órganos extraídos se transportaron en refrigeración en tubos falcon o frascos de urocultivo estériles (dependiendo del tamaño del órgano), para ser procesados en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Adicionalmente, se tomaron muestras de materia fecal a partir de los ciegos, los cuales se transportaron en refrigeración, se recolectaron en tubos estériles Eppendorf y se almacenaron a - 80 °C. También, en algunos casos, se tomaron muestras de sangre

en tubos heparinizados (**Figura 26B**). Las determinaciones realizadas en cada ensayo se describen a continuación.

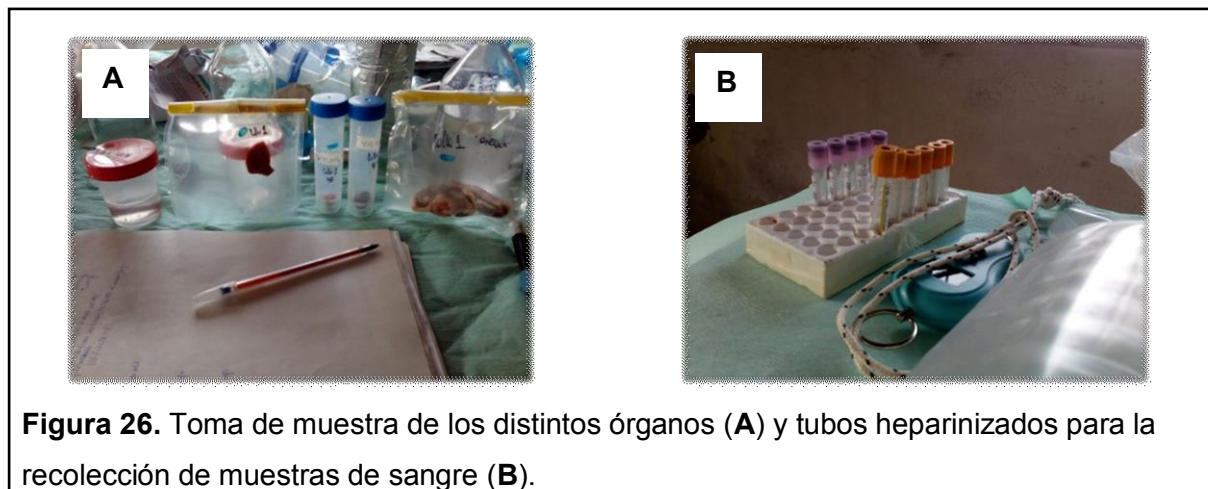


Figura 26. Toma de muestra de los distintos órganos (**A**) y tubos heparinizados para la recolección de muestras de sangre (**B**).

3.2.5.4 Administración del producto probiótico a pollos parrilleros: 1° ensayo

3.2.5.4.1 Análisis de translocación de microorganismos en hígado

Se estudió la capacidad de translocación a hígado de bacterias lácticas y de enterobacterias. En condiciones de esterilidad, se pesó 1 g de hígado y se realizó una dilución 1/10 con solución salina estéril. Luego se homogenizó utilizando un homogeneizador de paletas de laboratorio (BagMixer® 400W Interscience) y, a partir de diluciones seriadas, se tomaron alícuotas y sembraron en MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) y Mac Conkey (Merck®, Darmstadt, Alemania) para determinar la concentración de bacterias lácticas y enterobacterias, respectivamente. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 - 48 horas. Las concentraciones bacterianas se expresaron como UFC/g de hígado.

3.2.5.4.2 Análisis histopatológico de intestino

Se tomó una porción de intestino delgado, realizando el corte aproximadamente unos 6 cm luego de la finalización de la molleja, zona que corresponde al duodeno. La muestra se depositó en un frasco de urocultivo, inmersa en formol al 10 % v/v.

El procesamiento y estudio histopatológico de las muestras fue realizado por la Vet. Silvina Pintos en su laboratorio de estudios patológicos, especializado en patología aviar. Siguiendo procedimientos estandarizados, las muestras fueron cortadas y colocadas en *cassettes* plásticos, para luego sufrir una deshidratación progresiva

mediante la inmersión en soluciones de etanol de graduación creciente. El aclaramiento se realizó con xilol para permitir que actúe la parafina en el siguiente paso de inclusión, realizado en una estufa de cultivo con parafina. Por último, los tacos de parafina se cortaron con un micrótopo de rotación Rietchert-Jung con cortes de 5 micras y fueron coloreados mediante la técnica de coloración con Hematoxilina-Eosina.

Para la evaluación del estado de la mucosa intestinal, se determinaron dos parámetros: *score de inflamación* y *pérdida de integridad*, a los cuales se les asignó un puntaje (score) de acuerdo a la **Tabla 20** (Gibson-Corley et al., 2013).

Tabla 20. Escala de puntajes asignados para cuantificar el estado de la mucosa intestinal a través de la pérdida de la integridad y el score de inflamación.

SCORE	PÉRDIDA DE LA INTEGRIDAD	SCORE DE INFLAMACIÓN
1	ausencia de pérdida de la integridad	ausencia de inflamación
2	engrosamiento de las vellosidades con leve degeneración vacuolar de los enterocitos	edema en la lámina propia con leve infiltrado linfomonocitario
3	engrosamiento de las vellosidades con moderada degeneración vacuolar de los enterocitos y fusión de aisladas vellosidades	hiperemia en la lámina propia con moderado infiltrado linfomonocitario
4	engrosamiento de las vellosidades con severa degeneración vacuolar de los enterocitos y fusión en masa de las vellosidades	hiperemia con extravasación eritrocitaria y severo infiltrado linfomonocitario

Adicionalmente, se evaluó la histomorfometría intestinal teniendo en cuenta los siguientes parámetros: longitud de las vellosidades, profundidad de las criptas y relación vellosidad-cripta. Las mediciones se realizaron empleando el software Image J (National Institutes of Health, Estados Unidos).

3.2.5.4.3 Determinación de microorganismos en el contenido intestinal

A partir de los ciegos, se recolectaron muestras de materia fecal en condiciones de esterilidad. Se analizaron las poblaciones microbianas presentes en el contenido cecal utilizando una técnica microbiológica tradicional (recuento en placa) y una técnica molecular (PCR en tiempo real). Para el recuento en placa, se tomó una alícuota de la muestra, se realizaron diluciones seriadas en solución salina estéril y se sembraron en los medios MRS, Mac Conkey y Triptosa Sulfito Cicloserina (TSC). Los mismos se incubaron a 37 °C durante 24 - 48 horas. Las placas de MRS y Mac Conkey fueron incubadas en condiciones de aerobiosis, y las de agar TSC en anaerobiosis.

Para la determinación por PCR en tiempo real, las muestras fueron congeladas a - 80 °C. El ADN total del contenido intestinal se obtuvo utilizando un kit de extracción (Quick Tissue/Culture Cells Genomic DNA Extraction Kit 50 prep 50 prep DSBIO) (**Anexo 2**).

3.2.5.4.4 Pesaje de animales

Se determinó el peso promedio de cada grupo/tratamiento de pollos a lo largo del ciclo de crianza, de forma semanal. Para cada pesaje, se formaron grupos de animales y se pesaron en baldes de plástico o sujetos de las patas, de acuerdo a la edad. Se utilizó una balanza digital portátil (modelo dj601, marca Oryx).

3.2.5.4.5 Análisis bioquímico de suero

Previo al sacrificio de las aves (días 16, 30 y 43 de vida), se recolectaron de 2 - 3 ml de sangre (de acuerdo a la edad y tamaño de animal) de la vena alar en tubos de plástico heparinizados. Los siguientes parámetros fueron determinados por el Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, mediante técnicas espectrofotométricas: concentración de enzimas hepáticas (TGO y TGP), fosfatasa alcalina, hematocrito, colesterol total y triglicéridos, proteínas totales (TP), albúmina (Alb), urea, creatinina y globulina. También se determinaron los niveles de aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y gamma-glutamilttransferasa (GGT).

3.2.5.4.6 Pesaje de bolsa de Fabricio y bazo

A partir del sacrificio de los animales, se tomaron la bolsa de Fabricio y el bazo y se depositaron en bolsas de plástico o tubos falcon (de acuerdo al tamaño del animal), previamente tarados. Al llegar al laboratorio, se pesaron los órganos en una balanza analítica (modelo AS220, "Radwag", Polonia) y se determinó la relación bolsa de Fabricio/ bazo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Relación [Bolsa de Fabricio/Bazo]} = \frac{\text{Peso bolsa de Fabricio}}{\text{Peso del bazo}} \quad \text{Ecuación 9}$$

3.2.5.4.7 Análisis estadístico

Los resultados del análisis histopatológico de intestino y pesaje de animales fueron analizados estadísticamente por medio del test de ANOVA con dos factores y luego test

de Bonferroni para comparaciones múltiples; la evaluación de los resultados de la relación entre los pesos de bolsa de Fabricio/Bazo se realizó mediante el test de ANOVA con dos factores y luego test de Tukey para comparaciones múltiples. En todos los casos se determinaron como estadísticamente significativos cuando se obtuvo un valor de $p < 0,05$ y con un nivel de significancia menor a $0,05$ ($\alpha < 0,05$). Para realizar los gráficos y el análisis estadístico se utilizó el programa informático GraphPadPrism versión 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3.2.5.5 Administración del producto probiótico a pollos parrilleros: 2° ensayo

3.2.5.5.1 Determinación del contenido de materia grasa total en hígado

Luego del sacrificio, los hígados fueron recolectados en condiciones de esterilidad, se pesaron y se conservaron en congelación hasta su envío para la determinación del porcentaje de materia grasa total por el método de Soxhlet. La misma fue realizada por el laboratorio del sector de Calidad Cárnica y Nutrición perteneciente a la Estación Experimental Agropecuaria EEA-INTA Concepción del Uruguay-Entre Ríos. Brevemente, el método de Soxhlet consiste en la deshidratación previa de la muestra y posterior extracción de la grasa con éter de petróleo como solvente. La cantidad de grasa se expresó como porcentaje en base al peso seco.

3.2.5.5.2 Análisis histopatológico de intestino

La metodología se detalló previamente en la **Sección 3.2.5.4.2** del 1° Ensayo *in vivo*.

3.2.5.5.3 Determinación de microorganismos en el contenido intestinal

Se estudió la población microbiana del contenido intestinal mediante PCR en tiempo real, de acuerdo a lo explicado en la **Sección 3.2.5.4.3** del 1° Ensayo *in vivo*.

3.2.5.5.4 Pesaje de animales

Se determinó el peso promedio de cada grupo/tratamiento de pollos a lo largo del ciclo de crianza de igual forma que lo expresado en la **Sección 3.2.5.4.4** del 1° Ensayo *in vivo*.

3.2.5.5.5 Pesaje de bolsa de Fabricio y bazo

Se realizó el pesaje de la bolsa de Fabricio y del bazo, y se calculó la relación de estos pesos, de igual forma que lo expresado en la **Sección 3.2.5.4.6** del 1° Ensayo *in vivo*.

3.2.5.5.6 Análisis estadístico

La evaluación estadística de los resultados obtenidos se realizó de acuerdo a lo detallado en la **Sección 3.2.5.4.7** del 1° Ensayo *in vivo*.

3.3 Resultados y Discusión

3.3.1 Selección de aislados para ensayos *in vivo*

A partir de los 10 aislados evaluados en el **Capítulo 2**, se realizó una nueva selección para los ensayos en pollos. Ésta se fundamentó en los resultados obtenidos, respecto a la actividad inhibitoria de los sobrenadantes libres de células (SLC) sobre *Salmonella* y *E. coli* (**Sección 2.3.2, Capítulo 2**) y el efecto de los cultivos completos y los SLC de los aislados de *Lactobacillus* frente a *Salmonella enterica in vitro* (**Sección 2.3.1, Capítulo 2**). Adicionalmente, se tuvieron en cuenta las investigaciones realizadas por otros tesisistas del laboratorio que trabajaban conjuntamente en el marco del proyecto PID 2014-0049, proyecto que dio lugar al desarrollo de esta Tesis. De acuerdo a las investigaciones mencionadas, se tuvo en consideración la acción antifúngica de los aislados mediante la capacidad de captura de aflatoxina B1 (toxina fúngica) y el porcentaje de reducción de la germinación de *Aspergillus flavus*. En dicho estudio, se determinó que los mayores valores de reducción de la germinación de los conidios de *A. flavus* fueron del 50 % y 60 % en presencia de los SLC de *L. agilis* 1235C y *L. salivarius* 1234C, respectivamente, calificándose dentro del rango de efecto moderado. Adicionalmente, *L. agilis* 1235C demostró una alta capacidad de secuestrar aflatoxina AFB1 *in vitro*, alcanzando un valor del 60 %, de acuerdo a Valiente (2018) (datos no publicados).

Resultados obtenidos por Cejas (2017) (datos no publicados), respecto a *Enterococcus* sp.1, *Enterococcus* sp. 2 y *Enterococcus* sp. 3, permitieron determinar que los tres aislados presentaron una alta termotolerancia en condiciones simuladas de pelleteo. Además, el estudio de los enterococos nos permitiría agregar microorganismos de diferentes géneros bacterianos al probiótico que se pretende desarrollar en esta Tesis. También se consideró para la selección, los parámetros de crecimiento (concentración y pH a las 48 horas) en el medio de cultivo permeado de suero suplementado con extracto de levadura (**Sección 1.3.5, Capítulo 1**).

De acuerdo a los resultados obtenidos de los estudios descritos anteriormente, los aislados *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C, *L. johnsonii* 1236B, *L. johnsonii* 1237Y y los tres aislados del género *Enterococcus* sp., fueron seleccionados para continuar con su estudio y, posteriormente, formular el producto probiótico que será administrado a los pollos *in vivo*.

3.3.1.1 Crecimiento en MRS suplementado con permeado de suero

Se estudió el crecimiento de los aislados en dos medios de cultivo sugeridos por NITRAP SRL. Por un lado, se evaluó el uso de MRS comercial suplementado con permeado de suero (MRS + PS) con el objetivo de disminuir los costos de producción. La justificación para utilizar el PS para el crecimiento de los aislados se detalló en el **Capítulo 1 (Sección 1.3.5)**. Por otro lado, se evaluó el crecimiento de los aislados en MRS formulado a partir de cada componente ya que es la manera en la que se prepara el medio de cultivo para la obtención de biomasa en NITRAP SRL.

Se estudió el crecimiento de *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C, *L. johnsonii* 1236B, *L. johnsonii* 1237Y, *Enterococcus* sp. 1, *Enterococcus* sp. 2 y *Enterococcus* sp. 3 en el medio MRS (5 % p/v) + PS (5 % p/v). El pH inicial del medio de cultivo (sin inocular) fue 5,7 y la concentración inicial de los aislados de *Lactobacillus* y de *Enterococcus* sp. fue de $1,2 \pm 0,3 \times 10^7$ UFC/ml y $3,8 \pm 1,6 \times 10^6$ UFC/ml, respectivamente. Sólo *Enterococcus* sp. 1 presentó una concentración inicial menor ($1,3 \times 10^4$ UFC/ml). Los resultados se presentan a continuación (**Tabla 21**).

Tabla 21. Determinación de la concentración microbiana y pH de *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C, *L. johnsonii* 1236B, *L. johnsonii* 1237Y, *Enterococcus* sp. 1, *Enterococcus* sp. 2 y *Enterococcus* sp. 3 en el medio MRS+PS durante el crecimiento durante 24 y 48 horas a 37 °C. Los valores de concentración se expresaron como promedio \pm DE.

Aislado	Tiempo 24 horas		Tiempo 48 horas	
	Concentración (UFC/ml)	pH	Concentración (UFC/ml)	pH
<i>L. salivarius</i> 1234C	$3,0 \pm 0,1 \times 10^9$	4,2	$4,3 \pm 0,4 \times 10^9$	4,1
<i>L. agilis</i> 1235C	$2,1 \pm 0,7 \times 10^9$	4,1	$7,6 \pm 0,4 \times 10^8$	4,0
<i>L. johnsonii</i> 1236B	$2,4 \pm 0,5 \times 10^9$	4,2	$3,0 \pm 0,4 \times 10^9$	4,1
<i>L. johnsonii</i> 1237Y	$2,4 \pm 0,1 \times 10^9$	4,2	$3,6 \pm 0,4 \times 10^9$	4,1
<i>Enterococcus</i> sp. 1	$5,3 \pm 4,7 \times 10^8$	4,1	$6,6 \pm 0,0 \times 10^6$	4,0
<i>Enterococcus</i> sp. 2	$1,6 \pm 0,4 \times 10^8$	5,5	$1,7 \pm 0,1 \times 10^8$	5,0
<i>Enterococcus</i> sp. 3	$1,6 \pm 0,4 \times 10^8$	5,4	$2,2 \pm 0,1 \times 10^8$	4,9

Todos los aislados fueron capaces de crecer en el medio MRS + PS. A las 24 horas de incubación, todos los *Lactobacillus* sp. y *Enterococcus* sp. 1 alcanzaron un pH de alrededor de 4, mientras que *Enterococcus* sp. 2 y 3, obtuvieron un valor de 5,5. Respecto a los valores de concentración, los aislados de *Lactobacillus* sp. alcanzaron un valor de 10^9 UFC/ml y los *Enterococcus* sp., un orden por debajo. Pasadas las 48

horas de incubación a 37 °C, todas las concentraciones se mantuvieron en el mismo orden respecto a las 24 horas iniciales, a excepción de *Enterococcus* sp. 1, el cual disminuyó su concentración en dos órdenes de magnitud.

Seguidamente, se confeccionó una tabla con los datos de concentración y pH en cada medio de cultivo evaluado, los cuales fueron expuestos en esta Sección y en las **Tablas 8 y 9**, correspondientes a la **Sección 1.3.5** del **Capítulo 1**. A fin de simplificar la comparación entre los parámetros mencionados, se presenta la **Tabla 22**.

Tabla 22. Crecimiento de *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C, *L. johnsonii* 1236B, *L. johnsonii* 1237Y, *Enterococcus* sp. 1, *Enterococcus* sp. 2 y *Enterococcus* sp. 3 en diferentes medios de cultivo durante 24 horas a 37 °C. La información fue extraída de ensayos realizados en el **Capítulo 1 (Sección 1.3.5)** y **Capítulo 3 (Sección 3.3.1.1)**. ND: No Determinado.

Aislado	MRS (5 % p/v) +PS (5 % p/v)		PS (5 % p/v)		PS (5 % p/v) +Ext. lev (1 % p/v)		MRS (Biokar®)	
	Nf* (UFC/ml)	pH	Nf (UFC/ml)	pH	Nf (UFC/ml)	pH	Nf (UFC/ml)	pH
<i>L. salivarius</i> 1234C	3,0 ± 0,1 x 10 ⁹	4,2	1,3 ± 0,3 x 10 ⁸	3,8	3,3 ± 0,5 x 10 ⁷	4,0	1,0 ± 0,2 x 10 ⁹	4,0
<i>L. agilis</i> 1235C	2,1 ± 0,7 x 10 ⁹	4,1	3,6 ± 0,6 x 10 ⁸	3,8	5,0 ± 1,0 x 10 ⁸	3,8	1,8 ± 1,0 x 10 ⁹	4,0
<i>L. johnsonii</i> 1236B	2,4 ± 0,5 x 10 ⁹	4,2	3,3 ± 0,1 x 10 ⁹	4,9	1,4 ± 0,3 x 10 ⁸	4,1	ND	ND
<i>L. johnsonii</i> 1237Y	2,4 ± 0,1 x 10 ⁹	4,2	3,3 ± 0,9 x 10 ⁷	4,7	2,6 ± 0,9 x 10 ⁸	4,0	ND	ND
<i>Enterococcus</i> sp. 1	5,3 ± 4,7 x 10 ⁸	4,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Enterococcus</i> sp. 2	1,6 ± 0,4 x 10 ⁸	5,5	ND	ND	ND	ND	1,0 ± 0,3 x 10 ⁹	4,0
<i>Enterococcus</i> sp. 3	1,6 ± 0,4 x 10 ⁸	5,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*Nf: concentración microbiana al final de la incubación.

De acuerdo a lo expuesto en el **Capítulo 1 (Sección 1.3.5)**, el factor determinante para la selección del medio de cultivo fue la obtención de mayor cantidad de biomasa en el menor tiempo, dado que los microorganismos vivos serán los administrados a los pollos durante su crianza. Por lo que, a fin de facilitar la preparación del producto probiótico a escala laboratorio, se tuvo como objetivo obtener el mayor recuento posible (Hrnčár et al., 2014; Atela et al; 2019).

El objetivo de medir el pH fue sólo poder determinar la actividad acidificante de las bacterias en el medio de cultivo.

Las mayores concentraciones de *L. salivarius* 1234C y *L. agilis* 1235C fueron alcanzadas en los medios de cultivo MRS comercial y MRS + PS, en el orden de 10⁹ UFC/ml. La obtención de estos valores podría explicarse teniendo en cuenta que el MRS es un medio diseñado para el crecimiento de estos microorganismos y aporta una gran variedad de nutrientes y factores de crecimiento, lo cual favorece el desarrollo de las

bacterias y el aumento de su concentración. Debido a que el MRS comercial es un medio de cultivo costoso, las opciones más rentables para el crecimiento de estos lactobacilos sería el medio formulado MRS + PS. Este dato es importante teniendo en cuenta los grandes volúmenes de producción que se manejan a gran escala, donde se podría reducir el costo económico relacionado al medio de cultivo utilizado para el desarrollo de las bacterias, reemplazando parte del MRS por el PS, el cual tiene un costo menor respecto al primero. En referencia al crecimiento de los aislados *L. johnsonii* 1236B y 1237Y, los mayores recuentos se obtuvieron en el medio MRS + PS, alcanzando concentraciones del orden de 10^9 UFC/ml; para el caso de *L. johnsonii* 1236B, también se podría utilizar el medio PS para obtener una concentración en el mismo orden logarítmico. Entonces, si se tuviera que elegir un único medio de cultivo para la obtención de mayor cantidad de biomasa en condiciones de tiempo y temperatura iguales a las utilizadas con MRS, podría seleccionarse el medio MRS + PS para el crecimiento de los cuatro lactobacilos.

Respecto a *Enterococcus* sp. 2, se evaluó el crecimiento en los medios MRS + PS y MRS comercial. La mayor concentración se obtuvo en el medio MRS comercial, en el orden de 10^9 UFC/ml mientras que, en el otro medio, la concentración estuvo un orden por debajo (10^8 UFC/ml). Por lo tanto, de los medios evaluados, el MRS comercial sería el medio indicado para su crecimiento.

Todos los aislados demostraron capacidad de crecimiento en medios de cultivos formulados, diferentes al medio MRS comercial, alcanzado valores de concentración comparables con los obtenidos en el medio de crecimiento tradicional comercial.

3.3.1.2 Viabilidad durante el almacenamiento a temperaturas de refrigeración

Debido a que la evaluación exhaustiva de los diferentes métodos de preservación de los aislados seleccionados en este trabajo escapa al objetivo general de la Tesis, y dado que necesitábamos conservar los aislados por un período de tiempo máximo equivalente a la duración de un ciclo completo de crianza (42 - 45 días) para los posteriores ensayos *in vivo*, se evaluó la estabilidad de los aislados a corto plazo en condiciones de refrigeración.

Se estudió la viabilidad del pellet bacteriano obtenido a partir del cultivo de *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C, *L. johnsonii* 1236B y *L. johnsonii* 1237Y durante el almacenamiento a 4 °C durante un período de 3 semanas. No se incorporaron sustancias crioprotectoras en este ensayo. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 23**.

Tabla 23. Viabilidad del pellet bacteriano de *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C, *L. johnsonii* 1236B y *L. johnsonii* 1237Y en el almacenamiento en refrigeración por 7 días.

Aislado	Recuento inicial (UFC/ml)	Recuento (7 días) (UFC/ml)
<i>L. salivarius</i> 1234C	^a $1,8 \pm 0,1 \times 10^8$	^d $2,2 \pm 0,2 \times 10^4$
<i>L. agilis</i> 1235C	^b $3,8 \pm 0,6 \times 10^8$	^c $1,6 \pm 0,2 \times 10^8$
<i>L. johnsonii</i> 1236B	^a $3,6 \pm 0,4 \times 10^7$	^d $5,3 \pm 2,7 \times 10^3$
<i>L. johnsonii</i> 1237Y	^a $6,9 \pm 2,3 \times 10^7$	^d $7,4 \pm 4,0 \times 10^3$

Los valores de concentración se expresaron como promedio \pm DE. Evaluación estadística: ANOVA de un factor, test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha = 0,05$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

L. agilis 1235C demostró la mayor resistencia en el almacenamiento a temperaturas de refrigeración. Aunque se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la concentración a tiempo cero y al cabo de 7 días, el recuento se mantuvo en el mismo orden. La concentración de los demás aislados evaluados disminuyó hasta cuatro órdenes logarítmicos, indicando que la viabilidad fue severamente afectada por el almacenamiento a bajas temperaturas, sin el uso de sustancias crioprotectoras.

Por lo tanto, dado que el objetivo es que los microorganismos se mantengan viables durante un período de crianza de los pollos, los resultados obtenidos condujeron a estudiar la congelación de los aislados.

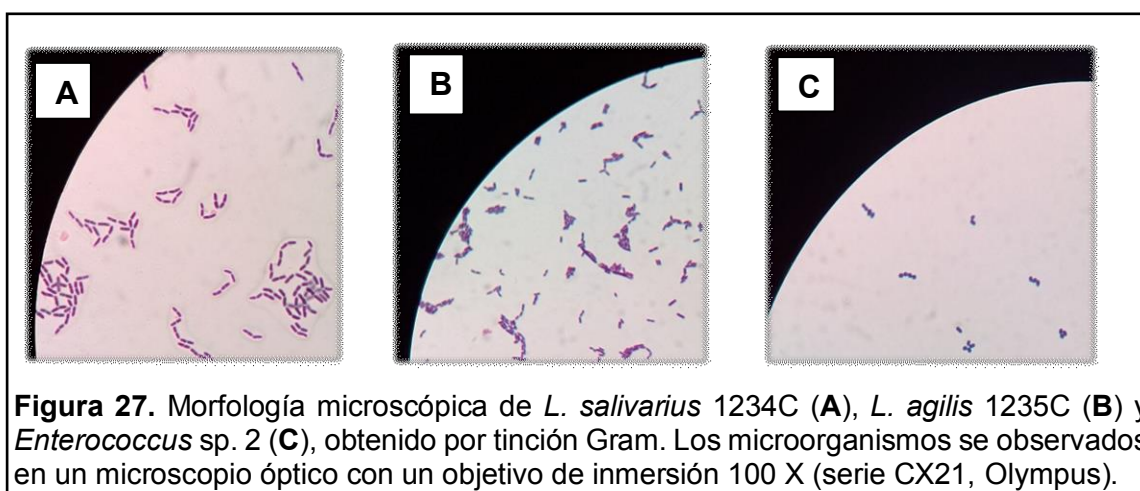
3.3.2 Selección de los aislados para formular el producto probiótico

Como se dijo previamente, parte de los estudios realizados por otras tesis que participaron en el proyecto en el que se enmarca esta Tesis fueron muy importantes para la toma de decisiones y avanzar con los objetivos propuestos.

En base al concepto de desarrollar un producto probiótico, que pueda ser utilizado para situaciones diferentes en producción aviar, se pensó en su formulación a partir de diferentes géneros bacterianos. De esta manera, estudios realizados por Lujan Cejas (2017) (datos no publicados) estuvieron dirigidos a evaluar las propiedades tecnológicas de los aislados de *Enterococcus* sp. Uno de ellos fue la resistencia a las altas temperaturas, realizando dos calentamientos sucesivos: a 75 °C durante 35 segundos y a 85 °C durante 5 segundos, simulando las condiciones de pelleteo del alimento balanceado de pollos. Se observó que *Enterococcus* sp. 2 fue el aislado más termorresistente, con un descenso en la viabilidad dos órdenes logarítmicos (de $2,3 \pm 0,3 \times 10^8$ UFC/ml a $1,73 \pm 0,3 \times 10^6$ UFC/ml.); mientras que en el caso de *Enterococcus* sp. 3 y *Enterococcus* sp.1, la viabilidad descendió 2,75 y 3 órdenes logarítmicos,

respectivamente. Por lo tanto, los resultados indicaron que el *Enterococcus* 2 es el aislado más termorresistente, una característica muy importante si se piensa en la elaboración de un pellet adicionado de estos microorganismos.

Sumado a esto, y de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo respecto al crecimiento en los diferentes medios de cultivos (**Sección 3.3.1.1** de este capítulo y **Sección 1.3.5, Capítulo 1**) y la viabilidad bacteriana a temperaturas de refrigeración (**Sección 3.3.1.2**), se seleccionaron los aislados *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C y *Enterococcus* sp. 2 para continuar con su estudio (**Figura 27**).



A modo de resumen, se destacan las principales características de los aislados que han sido seleccionados para la elaboración del producto probiótico:

- ***L. salivarius* 1234C**: respecto a sus características probióticas, fue capaz de resistir las condiciones simuladas del pasaje por el tracto gastrointestinal *in vitro* (7,5% resistencia, con un descenso en la concentración menor a un orden logarítmico) y fue el aislado con el mayor porcentaje de adhesión (2%) a células Caco-2/TC-7. Además, fue capaz de crecer en medios de cultivo alternativos al medio MRS comercial. Respecto al efecto de su presencia en coinubación con *Salmonella*, fue uno de los aislados que presentó mayor efecto inhibitorio, tanto el cultivo completo como la fracción microbiana y el SLC, por separado. Respecto a la acción inhibitoria de su SLC frente a microorganismos patógenos, evidenció una fuerte inhibición (mayor al 70 %), con efecto bactericida, en contacto con *Salmonella* y *E. coli*; también fue uno de los aislados con los mayores porcentajes de reducción (60 %) de la germinación de los conidios de *Aspergillus flavus*, de acuerdo a los resultados obtenidos por Carolina Valiente (2018) (datos no publicados).

- ***L. agilis* 1235C**: mantuvo su viabilidad durante el pasaje por las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal *in vitro*, con un porcentaje de supervivencia del 40 %, donde

la concentración disminuyó menos de un orden logarítmico al final del pasaje completo. Además, fue capaz de crecer en medios de cultivo alternativos al medio MRS comercial. El sobrenadante obtenido a partir del cultivo en MRS evidenció acción bactericida frente a *Salmonella* y *E. coli*, mientras que el producido a partir del cultivo en permeado de suero suplementado con extracto de levadura, generó el mismo efecto frente a *Salmonella*. También se constató su acción antifúngica, de acuerdo a lo realizado por Carolina Valiente (2018) (datos no publicados), con una alta capacidad de secuestro de aflatoxina AFB1 *in vitro* y los mayores porcentajes de reducción (50 %) de la germinación de los conidios de *A. flavus*. Respecto a la conservación de la fracción microbiana en refrigeración, fue el único aislado evaluado que mantuvo su concentración en el mismo orden logarítmico al cabo del almacenamiento a 4°C durante 7 días.

- ***Enterococcus* sp. 2**: fue resistente al pasaje por el tracto gastrointestinal *in vitro*, con un porcentaje de supervivencia del 5%, lo cual equivale a un descenso en la concentración menor a un orden logarítmico al final del pasaje. Además, fue capaz de crecer en medios de cultivo alternativos al medio MRS comercial. Respecto a la acción antimicrobiana del SLC obtenido a partir del cultivo en MRS, se determinó un fuerte efecto inhibitorio, de carácter bactericida, en el desarrollo de *Salmonella* y *E. coli*. De acuerdo a los resultados obtenidos por Luján Cejas (2017) (datos no publicados), fue el enterococo más termorresistente a las condiciones simuladas de pelleteo.

A partir de este momento, se denominará como producto probiótico tricepa a la mezcla compuesta por *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C y *Enterococcus* sp.2.

3.3.3 Caracterización de los aislados seleccionados para formular el producto probiótico

Para continuar con la caracterización de estos tres aislados, y teniendo en cuenta los intereses de la empresa y los estudios previos de conservación, se evaluó el crecimiento en MRS formulado a partir de cada componente, los cuales fueron provistos por NITRAP SRL (al igual que la formulación para prepararlo) y se determinó la viabilidad del pellet microbiano durante el almacenamiento a -20 °C y su estabilidad durante ciclos consecutivos de congelación y descongelación.

3.3.3.1 Crecimiento en MRS formulado a partir de cada componente

De acuerdo a lo estudiado en la **Sección 1.3.5 (Capítulo 1)**, se evaluaron diferentes medios de cultivo como alternativas al crecimiento de los aislados en MRS comercial, con el objetivo de obtener una alta cantidad de biomasa, utilizando medios de cultivo menos costosos. Como sugerencia de la empresa NITRAP SRL., se evaluó el crecimiento de los aislados en el medio MRS formulado a partir de cada componente. Para ello, se determinó la concentración y el pH a las 24 horas de incubación a 37 °C en el medio mencionado, teniendo en cuenta los valores de crecimiento obtenidos en MRS comercial (**Tabla 24**). La concentración del inóculo de *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C y *Enterococcus* sp. 2 fue $2,7 \pm 0,1 \times 10^7$ UFC/ml, $6,3 \pm 0,4 \times 10^8$ UFC/ml y $3,2 \pm 0,1 \times 10^8$ UFC/ml, respectivamente.

Tabla 24. Determinación de la concentración microbiana y pH de *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C y *Enterococcus* sp. 2 en los medios MRS formulado y MRS comercial (*Biokar*®) luego del crecimiento a 37 °C por 24 horas. Los valores de concentración se expresaron como promedio \pm DE. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Aislado	MRS comercial (<i>Biokar</i> ®)		MRS formulado	
	Concentración (UFC/ml)	pH	Concentración (UFC/ml)	pH
<i>L. salivarius</i> 1234C	^a $1,1 \pm 0,2 \times 10^9$	4,0	^b $9,9 \pm 2,8 \times 10^9$	3,8
<i>L. agilis</i> 1235C	^a $1,8 \pm 1,0 \times 10^9$	4,0	^a $2,3 \pm 0,5 \times 10^9$	3,8
<i>Enterococcus</i> sp. 2	^a $1,0 \pm 0,3 \times 10^9$	4,0	^c $4,1 \pm 3,3 \times 10^8$	3,8

Los tres aislados fueron capaces de crecer en el medio MRS formulado. La concentración de *L. agilis* 1235C no mostró diferencias significativas al comparar el crecimiento en los dos medios de cultivo. Sin embargo, mientras que el recuento de *L. salivarius* 1234C en MRS formulado fue significativamente mayor respecto al MRS comercial, en el caso de *Enterococcus* sp. 2, se obtuvo una mayor concentración en MRS comercial. De acuerdo a estos resultados, en el caso de tener que elegir uno de los dos medios de cultivo para el crecimiento de los aislados, se optaría por el medio MRS formulado para *L. salivarius* 1234C y *L. agilis* 1235C ya que además, como se mencionó anteriormente, es la manera en la que se prepara el medio de cultivo para la obtención de biomasa en NITRAP SRL; mientras que para el caso de del cultivo de *Enterococcus* sp. 2, se debería emplear el medio MRS comercial para obtener una mayor cantidad de biomasa.

Para la preparación del producto probiótico tricepa, los cultivos se realizaron de manera independiente a fin de poder ajustar la concentración de cada uno. Con el objetivo de determinar la cosecha máxima de cada bacteria láctica, se realizaron cinéticas de crecimiento en MRS formulado para los *Lactobacillus* sp. y MRS comercial para *Enterococcus* sp. 2, de acuerdo a los mayores recuentos obtenidos en dichos medios (Tabla 24). A diferentes tiempos de incubación a 37 °C, se determinó la absorbancia y la concentración microbiana por recuento en placa con agar MRS. Las cinéticas de crecimiento de *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C y *Enterococcus* sp. 2 se presentan en las Figuras 28 y 29. Las mediciones de absorbancia se realizaron hasta alcanzar un valor constante, a una longitud de onda de 620 nm para los *Lactobacillus* sp. y de 600 nm para el *Enterococcus* sp. 2.

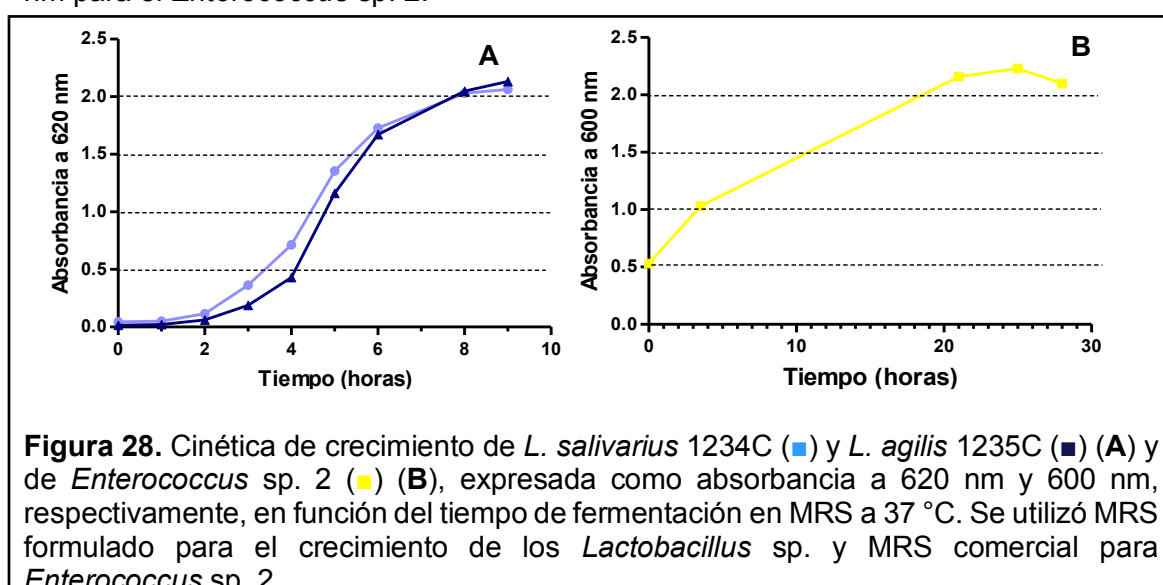


Figura 28. Cinética de crecimiento de *L. salivarius* 1234C (■) y *L. agilis* 1235C (■) (A) y de *Enterococcus* sp. 2 (■) (B), expresada como absorbancia a 620 nm y 600 nm, respectivamente, en función del tiempo de fermentación en MRS a 37 °C. Se utilizó MRS formulado para el crecimiento de los *Lactobacillus* sp. y MRS comercial para *Enterococcus* sp. 2.

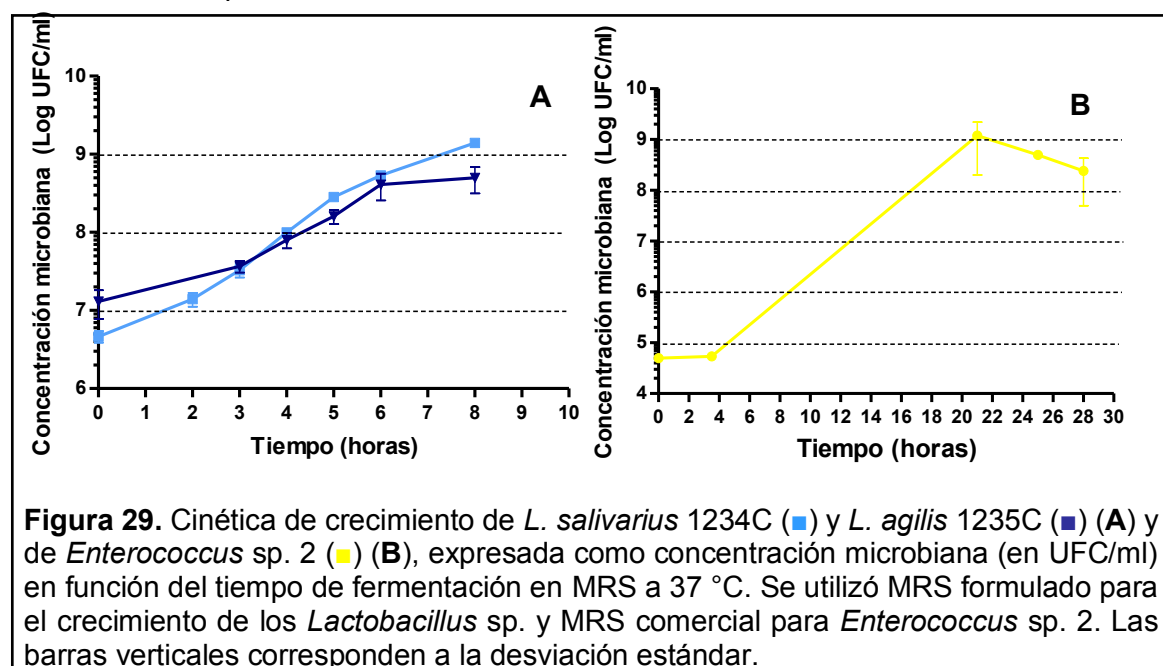


Figura 29. Cinética de crecimiento de *L. salivarius* 1234C (■) y *L. agilis* 1235C (■) (A) y de *Enterococcus* sp. 2 (■) (B), expresada como concentración microbiana (en UFC/ml) en función del tiempo de fermentación en MRS a 37 °C. Se utilizó MRS formulado para el crecimiento de los *Lactobacillus* sp. y MRS comercial para *Enterococcus* sp. 2. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar.

Para el caso de los aislados de *Lactobacillus* sp., la mayor concentración microbiana se obtuvo luego de 8 horas de incubación en MRS formulado, alcanzando un valor de $1,4 \pm 0,1 \times 10^9$ UFC/ml para *L. salivarius* 1234C y $5,0 \pm 1,8 \times 10^8$ UFC/ml para *L. agilis* 1235C. Sin embargo, en el caso de *Enterococcus* sp. 2, fueron necesarias 20 horas de incubación a 37 °C para conseguir la máxima concentración, alcanzando una concentración de $2,0 \pm 2,0 \times 10^8$ UFC/ml.

Estos datos serán utilizados al momento de preparar los cultivos para formular el producto probiótico tricepa que será administrado a los pollos en los ensayos *in vivo*.

3.3.3.2 Viabilidad durante el almacenamiento a temperaturas de congelación

Los microorganismos requieren de métodos de preservación adecuados para asegurar su óptima viabilidad, almacenamiento, pureza y estabilidad. Idealmente, se busca un proceso de conservación que permita obtener concentrados bacterianos con altas proporciones de bacterias viables y sin cambio en su actividad (Crittenden, 2009; Dodoo et al., 2017). Los procesos más utilizados son la congelación, la liofilización y la deshidratación por calor (secado por spray u otros) (Fonseca et al., 2015).

En la criopreservación, las células se someten a bajas temperaturas que promueven la formación de cristales de hielo en el medio de suspensión y dentro del interior de la célula. El desequilibrio osmótico resultante induce cambios físicos y químicos, como la pérdida de la integridad de la membrana, lo cual provoca daños estructurales y muerte celular (Lovelock, 1954; Fuller, 2004; Mazur, 2004; Woke, 2007). Para disminuir este tipo de daños, se utilizan sustancias crioprotectoras, como el glicerol y la leche, las cuales protegen a la célula bajando el punto de congelación del agua, promoviendo la formación de enlaces de hidrógeno y la vitrificación de solventes, y evitando la formación de cristales de hielo dentro de la misma (Fuller, 2004; Chian, 2010).

Por lo tanto, se evaluó el almacenamiento de *L. salivarius* 1234C y *L. agilis* 1235C durante 3 semanas a -20 °C y se utilizó leche entera estéril como sustancia crioprotectora.

Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 25**.

Tabla 25. Viabilidad del pellet bacteriano de *L. salivarius* 1234C y *L. agilis* 1235C durante 3 semanas a -20 °C.

Aislado	Concentración (UFC/ml)			
	Tiempo cero	1° semana	2° semana	3° semana
<i>L. salivarius</i> 1234C	^a 4,3 ± 0,4 x 10 ⁹	^b 3,0 ± 0,6 x 10 ⁹	^a 5,1 ± 0,3 x 10 ⁹	^c 2,0 ± 0,8 x 10 ⁹
<i>L. agilis</i> 1235C	^a 7,6 ± 0,4 x 10 ⁸	^a 2,4 ± 0,7 x 10 ⁸	^a 5,5 ± 1,0 x 10 ⁸	^a 2,0 ± 0,1 x 10 ⁸

Los valores de concentración se expresaron como promedio de UFC/ml ± DE al final de cada semana en congelación. Evaluación estadística: ANOVA de un factor, test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0,05$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

De acuerdo a lo realizado por Carolina Valiente (2017) (datos no publicados), la viabilidad del pellet bacteriano de *Enterococcus* sp. 2 se mantuvo sin diferencias significativas durante las 3 semanas de almacenamiento a -20 °C, en concentración del orden de 10⁸ UFC/ml.

La concentración de *L. agilis* 1235C no mostró diferencias significativas durante el total del tiempo evaluado, mientras que la concentración de *L. salivarius* 1234C varió significativamente. Sin embargo, el recuento de los dos aislados se mantuvo en el mismo orden logarítmico respecto al inicio del ensayo, a lo largo de las 3 semanas de almacenamiento en congelación.

A partir de estos resultados se seleccionó la criopreservación en leche a -20 °C como método de conservación para almacenar el producto probiótico hasta su utilización.

3.3.3.3 Estabilidad de los aislados durante ciclos consecutivos de congelación/descongelación

Al someter a los cultivos microbianos a procesos de congelación y descongelación se generan pérdidas en la viabilidad, incluso de varios ordenes logarítmicos. Por lo tanto, este tipo de estudios nos permiten tener una noción de la resistencia de la bacteria a este tipo de procesos, lo cual resulta una información muy importante a la hora de seleccionar cepas probióticas. Además, considerando que el producto probiótico se iba a transportar hasta el lugar donde se realizaría el ensayo *in vivo*, y que existía la probabilidad de descongelamiento en su transporte, se evaluó el efecto que tendría la congelación y descongelación de los mismos en la viabilidad, durante ciclos consecutivos. La fracción microbiana de cada aislado del producto probiótico tricepa se resuspendió en leche entera estéril y se almacenó a -20 °C. Cada 48 horas, durante cuatro ciclos sucesivos, se descongeló en su totalidad, se tomó una alícuota y se evaluó la viabilidad (**Tabla 26**).

Tabla 26. Viabilidad del pellet bacteriano de *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C y *Enterococcus* sp. 2, conservados en leche entera estéril, durante ciclos consecutivos de congelación/descongelación.

Aislados	Concentración microbiana (UFC/ml)				
	Tiempo cero	1° ciclo	2° ciclo	3° ciclo	4° ciclo
<i>L. salivarius</i> 1234C	^a 1,3 ± 0,9 x 10 ⁷	^a 1,4 ± 0,3 x 10 ⁷	^a 1,0 ± 4,2 x 10 ⁷	^a 2,2 ± 1,3 x 10 ⁷	^a 1,3 ± 0,2 x 10 ⁷
<i>L. agilis</i> 1235C	^b 6,3 ± 2,3 x 10 ⁸	^{b,c} 5,8 ± 0,2 x 10 ⁸	^b 4,3 ± 1,4 x 10 ⁸	^{b,c} 6,1 ± 0,1 x 10 ⁸	^c 7,9 ± 1,8 x 10 ⁸
<i>Enterococcus</i> sp. 2	^e 2,4 ± 1,9 x 10 ⁸	^d 7,0 ± 0,7 x 10 ⁸	^e 8,7 ± 0,5 x 10 ⁷	^e 7,0 ± 1,4 x 10 ⁷	ND

Los valores de concentración se expresaron como promedio ± DE. Evaluación estadística: ANOVA de un factor, test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha = 0,05$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). ND: no determinado.

La concentración de *L. salivarius* 1234C no evidenció diferencias estadísticamente significativas a lo largo de todo el ensayo, manteniendo su recuento siempre por encima del orden 10⁷ UFC/ml. En el caso de *L. agilis* 1235C, se vieron diferencias significativas en los recuentos a lo largo del ensayo, pero los valores se mantuvieron en el mismo orden logarítmico. La concentración de *Enterococcus* sp. 2 bajó levemente su concentración sin descender un orden logarítmico completo.

Este estudio nos permitió asegurar que el inóculo mantiene viable, con valores de microorganismos viables en el mismo orden, incluso si sufre hasta 2 ciclos de congelación/descongelación.

Se debe mencionar que, aunque los resultados obtenidos fueron suficientes para realizar los ensayos *in vivo* utilizando los cultivos congelados a -20 °C y leche como crioprotector, éste no sería un método adecuado para la comercialización del producto ya que se debería pensar en el tipo de transporte que se necesitaría y las recomendaciones de almacenamiento hasta su uso, teniendo en cuenta que se debería asegurar la cadena de frío en todo momento. De esta manera, para el escalado de la producción de estos aislados, se realizarán estudios de resistencia a la liofilización en la planta de NITRAP SRL.

La liofilización es una técnica utilizada desde hace varios años para la producción de probióticos deshidratados (de Valdez et al., 1985; Bolla et al., 2011; Jalali et al., 2012; Fonseca et al., 2015). Durante este proceso, las bacterias están expuestas al daño por temperaturas de congelación muy bajas y posterior deshidratación en vacío. Sin embargo, el uso de sustancias crioprotectoras permite conservar eficientemente la viabilidad bacteriana, generando daños mínimos a nivel estructural (Carvalho et al., 2004). Esto convierte a la liofilización en una de las mejores opciones para la conservación de microorganismos. En este sentido, es interesante mencionar que, en

un estudio en paralelo realizado durante este trabajo de investigación, se analizó la capacidad de *L. plantarum* 83114 conservado por liofilización de secuestrar Aflatoxina AFB1 *in vitro*. Se evaluaron diferentes condiciones de conservación de la cepa liofilizada y del secuestro de aflatoxina, con el microorganismo sólo y en combinación con zeolita. Los resultados demostraron que la viabilidad de la cepa disminuyó su concentración sólo en un orden logarítmico a los 20 días de almacenamiento en condiciones de temperatura y humedad no controladas. Además, su capacidad de secuestrar aflatoxina no se vio afectada por el proceso de liofilización (Moretti et al., 2018) (Ver publicación en el **Anexo 1**).

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de resistencia a las condiciones de refrigeración y congelación, puede concluirse que los aislados no mantuvieron su viabilidad a 4 °C durante los primeros 7 días. Sin embargo, a -20 °C y utilizando leche como crioprotector, *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C y *Enterococcus* sp. 2 sobreviven durante 3 semanas, manteniendo su concentración dentro del mismo orden logarítmico respecto al inóculo inicial. Adicionalmente, ambos lactobacilos junto a *Enterococcus* sp. 2, son estables a sucesivos ciclos de congelación / descongelación.

A continuación, se evaluará *in vivo* el carácter inocuo del producto probiótico tricepa conformado por *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C y *Enterococcus* sp.2.

3.3.4 Administración del producto probiótico a pollos parrilleros

En estos ensayos se les administró el producto probiótico a pollos parrilleros durante toda la crianza y se verificó mediante diferentes estudios si el mismo tenía carácter inocuo, es decir, si su consumo no generaba efectos adversos respecto al estado sanitario general del animal y si, además, promovía beneficios a nivel productivo, como la ganancia de peso.

Se realizaron dos ensayos en galpones de cría de pollos parrilleros de la zona de Luján. El tamaño del galpón era de 10 m de ancho por 100 m de longitud y los animales involucrados en esta investigación fueron alojados en un sector delimitado dentro de este galpón. En el resto del mismo se alojó la producción de aproximadamente 10.000 animales (10 pollos / m²). El sistema de alimentación y de suministro de agua en el galpón fue automatizado, mientras que, en el sector del ensayo, el suministro de alimento y agua se realizó en forma manual.

Las pruebas se llevaron a cabo en diferentes épocas del año: el 1° ensayo se realizó en Marzo - Abril y, el 2° ensayo, en Mayo - Junio. En varias secciones posteriores se hará hincapié en esta diferencia debido a que la temperatura del ambiente en esos períodos fue distinta, más considerando que se trabajó en condiciones reales, en granjas de producción. En Marzo - Abril, la temperatura promedio es de 16 – 22 °C mientras que, en Mayo - Junio, desciende a 10 - 13 °C (datos extraídos del sitio web “Climate-Data.org”). La temperatura ambiente es importante debido a que los pollitos de un día de vida no están preparados fisiológicamente para controlar su temperatura corporal por lo que el control de la temperatura ambiente post-nacimiento es crítico; entonces, su temperatura corporal dependerá básicamente de la temperatura del galpón (Shinder et al., 2007). La temperatura ambiente óptima durante la primera semana de vida oscila entre los 31 - 33 °C. Temperaturas superiores a este rango pueden inducir hipertermia y deshidratación, generando bajo consumo de alimento y retraso del crecimiento, ya que los animales dejarán de consumir alimento para disminuir la producción metabólica de calor (Faria Filho et al., 2005; Ferket & Gernat, 2006; Lara & Rostagno, 2013) y tratarán de bajar la temperatura corporal mediante el jadeo (Reece & Lott, 1982). En el otro extremo, bajas temperaturas pueden generar hipotermia e inducir hipertensión pulmonar con síndrome ascítico (acumulación patológica de líquido en la cavidad peritoneal) (Maxwell & Robertson, 1998), además de que los animales aumentarán el consumo de alimento para subir su temperatura corporal, sin generar ganancias de peso (May & Lott, 2001).

Los pollitos que sufren estrés térmico durante su primera semana de vida ven comprometido su bienestar, además de afectarse los índices de mortalidad y productivos, entre otros parámetros (Pantoja-Estrada, 2014). En el caso del primer ensayo, la calefacción fue controlada por medio de lámparas infrarrojas posicionadas en diferentes sectores del galpón en donde se encontraban los corrales con los animales del ensayo. En el segundo ensayo fue más difícil alcanzar la temperatura óptima para el crecimiento de los animales y hasta se detectaron diferencias de temperatura de 3 °C entre un tratamiento y otro en un mismo ensayo, el cual es un valor importante al referirse a pollitos de pocos días de vida. Esta es la razón principal por la que, en el caso de los dos ciclos de producción estudiados, se presentarán y se analizarán sus resultados como ensayos independientes. Otro tema a considerar es la variabilidad encontrada en los pollos, inherente a animales no provenientes de un bioterio, lo cual dificultó en algunas determinaciones poder analizar los datos de forma estadística y presentar valores promedio, junto a su desviación estándar. Sin embargo, es importante resaltar que el estudio fue realizado en condiciones reales, a campo.

El probiótico se administró en el agua de bebida ya que, en pollos parrilleros, es una manera eficiente y rentable de administrar los microorganismos (Karimi Torshizi et al., 2010; Blajman et al., 2014). Respecto a las dosis evaluadas, se ensayaron diferentes concentraciones). De acuerdo a la bibliografía, se han evaluado concentraciones variables de probióticos suministrados en el agua de bebida en producción aviar, con valores en el orden desde 1×10^4 UFC/ml hasta 1×10^9 UFC (Hrnčár et al., 2014; Gutiérrez et al., 2015; Pissula, 2018; Atela et al., 2019). En esta Tesis, se evaluaron dos concentraciones del producto probiótico tricepa: 10^7 UFC/ml y 10^5 UFC/ml. La elección de las concentraciones se basó en la bibliografía expuesta anteriormente y en las limitaciones de la metodología para obtener los cultivos en altas concentraciones en el laboratorio.

De acuerdo al consumo semanal de agua (Cobb Cares™, 2018), asumiendo que será el doble respecto al consumo de alimento, y con una temperatura ambiente promedio de 20 °C, el consumo de probiótico se encontrará en el rango de 10^6 - 10^8 UFC/pollo/semana en el caso del producto probiótico 10^7 UFC/ml, y de 10^4 - 10^6 UFC/pollo/semana para el producto probiótico 10^5 UFC/ml, a lo largo de un ciclo de crianza completo (aproximadamente, 42 días).

3.3.4.1 Administración del producto probiótico a pollos parrilleros: 1° ensayo

El total de animales al inicio del ensayo fue de 90 pollitos BB, con un peso promedio de 50,4 g, el cual es un valor aceptable de acuerdo al rango de pesos establecido para los pollitos de 0 a 24 horas de vida (Cobb Cares™, 2018). Las aves se dividieron en 3 tratamientos (grupos), de 30 animales cada uno y fueron ubicadas en corrales como se muestra en la **Figura 30**. Los grupos evaluados fueron los siguientes:

Tratamiento 1: la concentración final del producto probiótico tricepa en el agua de bebida fue de **10^7 UFC/ml**. Este grupo se identificó con el color **violeta**.

Tratamiento 2: la concentración final del producto probiótico tricepa en el agua de bebida fue de **10^5 UFC/ml**. Este grupo se identificó con el color **azul**.

Grupo control: no se les administró producto probiótico, sólo leche estéril diluida en el agua de bebida. Este grupo se identificó con el color **naranja**.



Con la llegada de los animales a la granja, se realizó una inspección clínica de los pollitos BB para determinar el estado general. Se observó cuidadosamente la actitud de las aves vivas, si el tamaño y desarrollo corporal estaban de acuerdo con la edad y la uniformidad en tamaño y peso. También se examinaron evidencias de signos respiratorios, incoordinación, tremor (temblor), parálisis, posición anormal de patas y alas, depresión y ceguera (Valladares de la Cruz, 2014). Al azar, se sacrificaron dos pollitos y se realizó la necropsia (identificación de lesiones macroscópicas en general). El examen incluyó la detección de la presencia de tumores, abscesos, cambios en la piel, condición del pico, lesiones inducidas por picaje y canibalismo, lesiones cutáneas y de las mucosas, evidencia de diarrea, empastamiento de las plumas alrededor de la cloaca; descargas nasales y respiratorias, blefaroconjuntivitis (conjuntivitis e inflamación del párpado), exudado conjuntival, estado de las plumas y de la cresta y barbillas, deshidratación y condición corporal general. La observación general no demostró presencia de alteraciones en los animales.

La temperatura ambiente promedio durante el experimento fue 20 °C (Luján). No se hallaron grandes diferencias de temperatura en el ambiente respecto al galpón; sólo fue necesaria la calefacción con una pantalla al momento de la recepción de los pollitos BB. Se realizaron tres sacrificios a lo largo del ciclo de producción: a los 16, 30 y 43 días.

3.3.4.1.1 Disposición de los animales respecto al galpón

Debido al aumento de tamaño de los animales, se debió modificar el tamaño y disposición de los corrales en el transcurso de la producción, siendo una distribución

entre el día 0 y el día 30 (**Figura 31**) y otra diferente, desde el día 31 hasta el final de la producción (**Figura 32**).

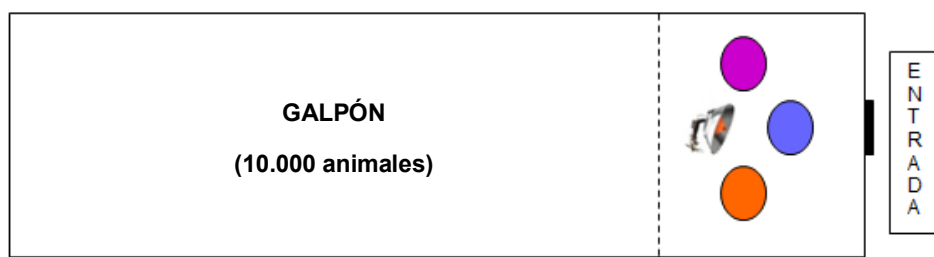


Figura 31. Disposición de los grupos/tratamientos durante los primeros 30 días de vida de los animales, donde cada círculo corresponde a los corrales del tratamiento 10^5 UFC/ml de producto probiótico tricepa (■), 10^7 UFC/ml de producto probiótico tricepa (■) y grupo control (■). Las líneas punteadas corresponden a la cortina plástica que separa los animales del ensayo del resto de los animales del galpón. Se muestra la posición de la lámpara.

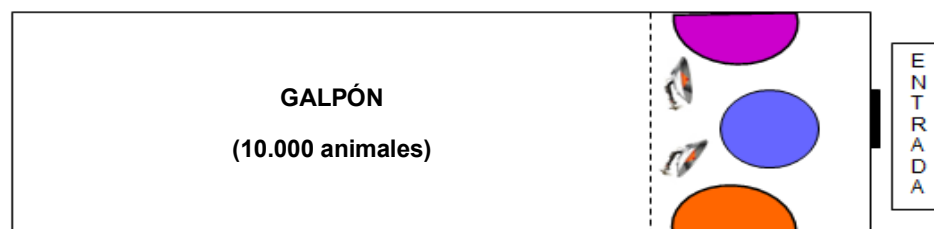


Figura 32. Disposición de los grupos/tratamientos desde el día 31 hasta finalizar el ciclo de producción, donde cada círculo corresponde a los corrales del tratamiento 10^5 UFC/ml de producto probiótico tricepa (■), 10^7 UFC/ml de producto probiótico tricepa (■) y grupo control (■). Las líneas punteadas corresponden a la cortina plástica que separa los animales del ensayo del resto de los animales del galpón. Se muestra la posición de las lámparas.

3.3.4.1.2 Análisis de la translocación de microorganismos en hígado

El consumo de probióticos puede ocasionar diversos efectos en el organismo de las aves, como la translocación a través del tejido epitelial, a partir de la cual los microorganismos son capaces de sobrevivir por varios días en el bazo y otros órganos, estimulando el proceso de fagocitosis y a las células inmunocompetentes del tejido linfático asociadas al intestino (Bellhorn & Macintire, 2004). La translocación ocurre cuando células viables presentes en la mucosa o el lumen intestinal penetran hasta los ganglios linfáticos mesentéricos (presentes en el tejido que rodea a los intestinos) y a otros órganos como el bazo y el hígado. El proceso de translocación está definido como el paso de bacterias endógenas viables (o sus productos) del tracto intestinal, a través de la barrera epitelial, a los ganglios linfáticos mesentéricos, circulación sistémica u

órganos extraintestinales. Debido a que el hígado es uno de los órganos principales en donde se detecta la translocación, se evaluó la presencia de bacterias lácticas y enterobacterias en ese órgano, en todos los tratamientos a lo largo de la producción. Las concentraciones bacterianas fueron determinadas mediante la técnica de recuento en placa, utilizando los medios de cultivo MRS y Mac Conkey.

Los resultados obtenidos se expresan en la **Tabla 27**.

Tabla 27. Determinación de la concentración de bacterias lácticas y enterobacterias (en UFC/g de órgano) en muestras de hígados correspondientes a los días 16, 30 y 43 de sacrificio, para cada tratamiento. *

Pollo	Edad del pollo	Tratamiento	MRS (UFC/g ± DE)	Agar Mac Conkey (UFC/g ± DE)
1	16 días	Control	$4,5 \pm 6,4 \times 10^1$	$> 10^4$
2	16 días	Control	$1,6 \pm 1,3 \times 10^2$	$> 10^4$
3	16 días	Control	$1,0 \pm 1,4 \times 10^3$	$> 10^4$
4	16 días	Control	$2,0 \pm 0 \times 10^1$	$> 10^4$
5	16 días	10^5 UFC/ml	$< 10^2$	$> 10^4$
6	16 días	10^5 UFC/ml	$7,9 \pm 0,2 \times 10^3$	$> 10^4$
7	16 días	10^5 UFC/ml	$< 10^2$	$> 10^4$
8	16 días	10^5 UFC/ml	$< 10^2$	$> 10^4$
9	16 días	10^7 UFC/ml	$3,9 \pm 1,2 \times 10^3$	$> 10^4$
10	16 días	10^7 UFC/ml	$< 10^2$	$1,6 \pm 0,1 \times 10^5$
11	16 días	10^7 UFC/ml	$< 10^2$	$> 10^4$
12	16 días	10^7 UFC/ml	$3,0 \pm 1,4 \times 10^3$	$> 10^4$
Pollo	Edad del pollo	Tratamiento	MRS (UFC/g ± DE)	Agar Mac Conkey (UFC/g ± DE)
1	30 días	Control	$3,5 \pm 0,5 \times 10^4$	$< 10^2$
2	30 días	Control	$< 10^2$	$< 10^2$
3	30 días	Control	$< 10^2$	$< 10^2$
4	30 días	Control	$< 10^2$	$< 10^2$
5	30 días	10^5 UFC/ml	$< 10^2$	$< 10^2$
6	30 días	10^5 UFC/ml	$< 10^2$	$< 10^2$
7	30 días	10^5 UFC/ml	$< 10^2$	$< 10^2$
8	30 días	10^5 UFC/ml	$6,6 \pm 0 \times 10^2$	$< 10^2$
9	30 días	10^7 UFC/ml	$< 10^2$	$< 10^2$
10	30 días	10^7 UFC/ml	$< 10^2$	$< 10^2$
11	30 días	10^7 UFC/ml	$< 10^2$	$9,9 \pm 0,4 \times 10^3$
12	30 días	10^7 UFC/ml	$< 10^2$	$< 10^2$

Pollo	Edad del pollo	Tratamiento	MRS (UFC/g ± DE)	Agar Mac Conkey (UFC/g ± DE)
1	43 días	Control	< 10 ²	< 10 ²
2	43 días	Control	3,3 ± 5,0 x 10 ²	3,3 ± 5,0 x 10 ²
3	43 días	Control	< 10 ²	< 10 ²
4	43 días	Control	< 10 ²	3,3 ± 5,0 x 10 ²
5	43 días	10 ⁵ UFC/ml	3,3 ± 5,0 x 10 ²	< 10 ²
6	43 días	10 ⁵ UFC/ml	< 10 ²	< 10 ²
7	43 días	10 ⁵ UFC/ml	< 10 ²	< 10 ²
8	43 días	10 ⁵ UFC/ml	< 10 ²	< 10 ²
9	43 días	10 ⁷ UFC/ml	3,3 ± 5,0 x 10 ²	< 10 ²
10	43 días	10 ⁷ UFC/ml	< 10 ²	< 10 ²
11	43 días	10 ⁷ UFC/ml	< 10 ²	< 10 ²
12	43 días	10 ⁷ UFC/ml	< 10 ²	< 10 ²

*Los valores son presentados de forma individual, sin calcular valores promedios ni desviaciones estándar por cada tratamiento

Los hígados de los pollos sacrificados a los 16 días de vida evidenciaron presencia de enterobacterias, en concentración mayor a 1 x 10⁴ UFC/g, inclusive los animales del grupo control. Una hipótesis que explicaría estos resultados sería la contaminación de las muestras con material intestinal/bilis ya que el hígado se tomó entero durante las necropsias y esto podría haber generado la contaminación mencionada. Alertados por el problema, se cambió la metodología, realizando la extracción de sólo una porción del órgano, y en los siguientes sacrificios (día 30 y día 43), la concentración estuvo por debajo de 10² UFC/g, en la mayoría de los casos. Por lo tanto, los recuentos obtenidos en las muestras del primer sacrificio podrían atribuirse a una dificultad técnica al momento de la extracción y no al proceso de translocación en sí. Respecto a la presencia de bacterias lácticas, la concentración estuvo en general por debajo de 10² UFC/g, tanto en los tratamientos como en el control. Aunque en algunos animales de cada grupo se encontró un bajo recuento de microorganismos que podrían indicar una posible traslocación de bacterias, los animales no desarrollaron ninguna patología, infección o daño en los tejidos, síntomas propios de la translocación. Tampoco se observó deterioro del estado general de salud de los animales.

En ciertos casos, los probióticos pueden impedir el proceso de translocación. De acuerdo a Blajman (2017), la presencia de la cepa probiótica *L. salivarius* DSPV 001P no provocó la translocación de la misma, ni de coliformes o enterobacterias a hígado.

Sin embargo, se ha observado que la presencia de bacterias en el hígado, a baja concentración, es normal en los animales, coincidiendo con los resultados encontrados en esta Tesis. De acuerdo a Latorre et al. (2015), la presencia del probiótico *Bacillus* sp. en la alimentación de un grupo de pollos redujo la translocación de enterobacterias a hígado, en un orden logarítmico, pero encontrando en el grupo control un recuento de 10 UFC/g. En el mismo sentido, Correa Franco (2018) evidenció un bajo número de bacterias en hígado de pollos (< 10 UFC/g) a los que se les administró bacterias lácticas aisladas de gránulo de kefir, y las mismas no tuvieron incidencia en el desarrollo de alguna enfermedad o en el estado general de salud de los animales tratados ni del grupo control. La translocación es un proceso complejo que depende de varios factores. Tellez et al. (2015) reportaron el efecto del tipo de alimentación en la translocación a hígado de enterobacterias en pavos, demostrando que las aves que comían maíz y centeno presentaron enterobacterias en el hígado de 10 y 10² UFC/g, respectivamente. Dicha investigación contribuye al argumento planteado de que es probable que en las aves se evidencien bacterias en el hígado en condiciones normales de crecimiento.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se podría decir que la administración del probiótico tricepa a pollos durante toda la crianza, en ambas dosis evaluadas, no favoreció la translocación de los microorganismos al hígado ya que se observaron resultados coincidentes entre los animales control y los tratados con el producto probiótico tricepa.

3.3.4.1.3 Análisis histopatológico del duodeno

Se evaluaron diferentes parámetros relacionados con la salud intestinal: pérdida de integridad y score de inflamación de la mucosa intestinal y relación vellosidad/cripta. La metodología utilizada para determinar la pérdida de integridad y la inflamación comprendió una evaluación histológica cualitativa y cuantitativa, con el objetivo de considerar la extensión de la superficie de absorción y la calidad de la mucosa (De Franceschi, 2011), asignando a cada uno un score para cuantificar las observaciones (Gibson, 2013). Ciertas investigaciones consideran que el aumento de la altura de las vellosidades intestinales es beneficioso para los pollos de engorde ya que vellosidades más altas indican epitelios más maduros y una función de absorción mejorada debido al aumento del área de absorción de las vellosidades (Caspary, 1992; Noy & Sklan, 1995; Zachos, 2016). También se genera un aumento en la actividad de las enzimas secretadas por los extremos de las vellosidades (Hampson, 1986), lo que resulta en una mejor digestibilidad (Caspary, 1992; Steiner, 2006; Gao et al., 2008;). En contraste, una

mayor profundidad de las criptas no es deseable ya que se considera indicador del recambio celular aumentado (Miles, 2006), lo que genera gastos de energía destinados al incremento del número de las células epiteliales en las criptas, relegando el crecimiento del animal (Kim et al., 2012; Murugesan et al., 2015). Se ha asociado una mayor altura de las vellosidades intestinales con el aumento de la productividad de pollos suplementados con diferentes microorganismos probióticos, tanto del grupo de bacterias lácticas (Eckert et al., 2010; Biloni et al., 2013; Cao et al., 2013; Rodríguez-González & Moreno-Figueredo, 2015) como de diferentes especies del género *Bacillus* sp. (Jayaraman et al., 2013; Afsharmanesh & Sadaghi, 2014) y algunas levaduras (Suresh et al., 2020).

De acuerdo a lo expresado en la **Tabla 20**, de la **Sección 3.2.5.4.2 (Materiales y Métodos)**, se clasificó la pérdida de integridad y el score de inflamación de acuerdo a los puntajes asignados al estado de la mucosa. Estos parámetros fueron evaluados a los días 16, 30 y 43 en duodenos de los animales del grupo control y los dos tratamientos. Los resultados se muestran en la **Figura 33 y 34**.

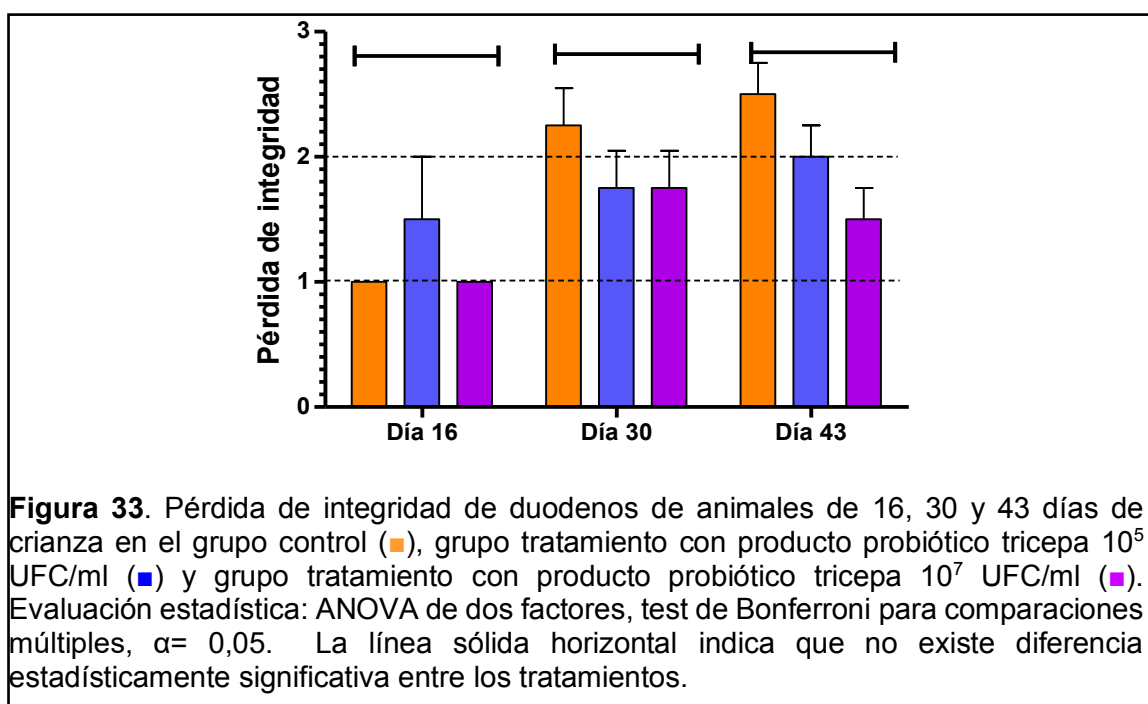
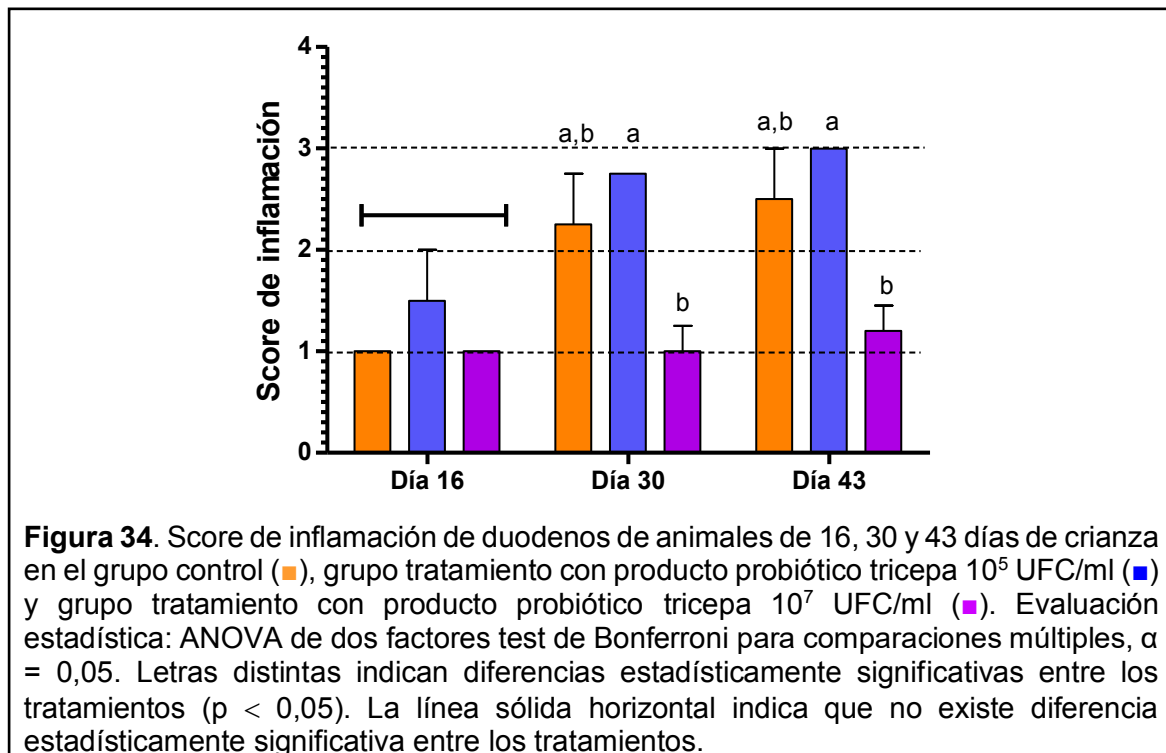


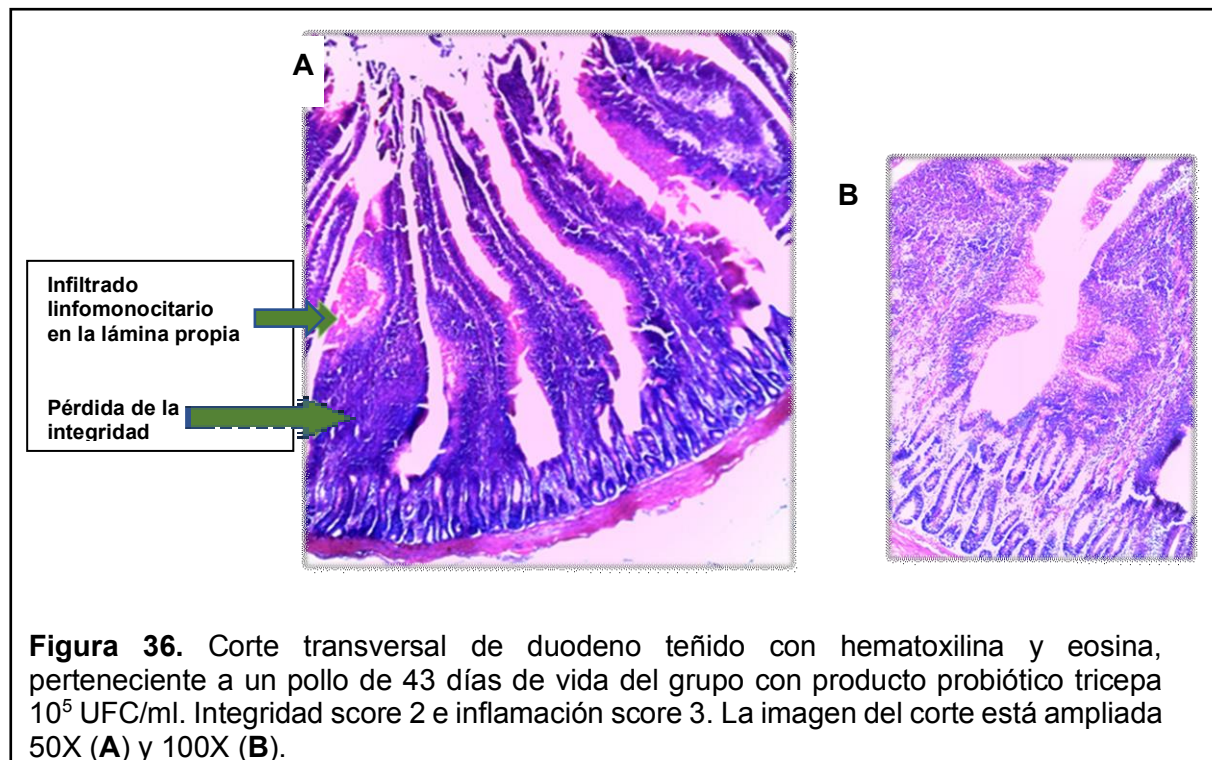
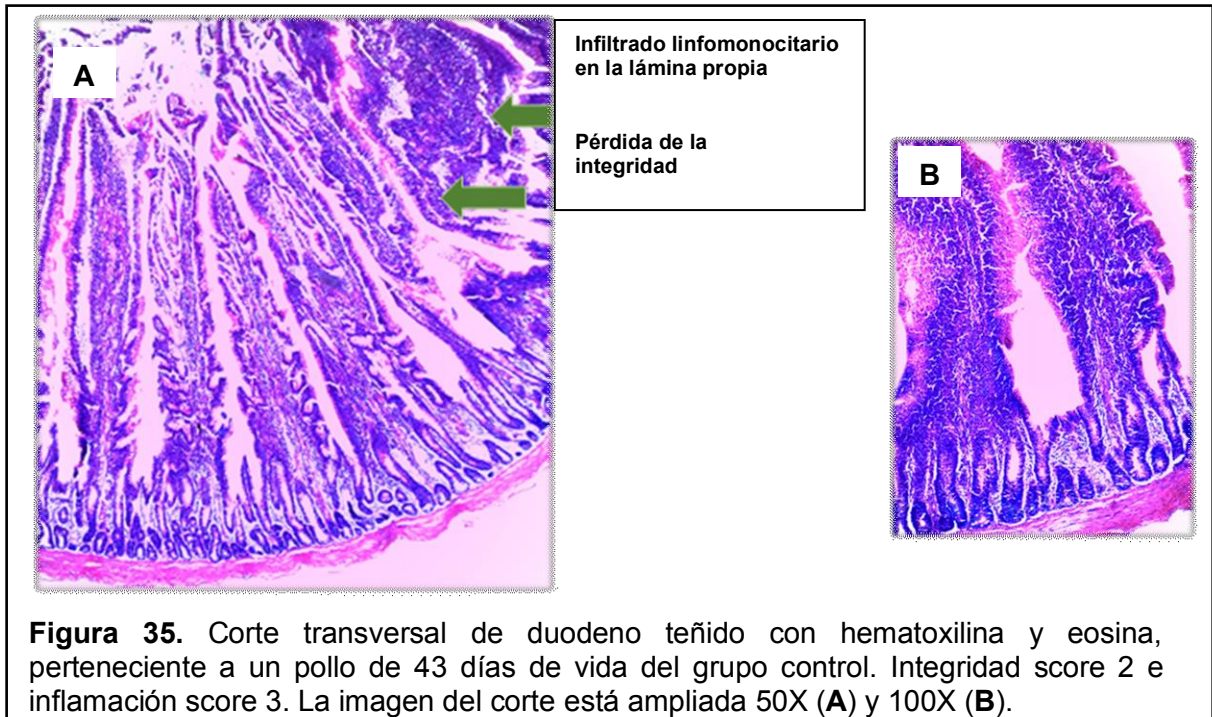
Figura 33. Pérdida de integridad de duodenos de animales de 16, 30 y 43 días de crianza en el grupo control (■), grupo tratamiento con producto probiótico tricepa 10⁵ UFC/ml (■) y grupo tratamiento con producto probiótico tricepa 10⁷ UFC/ml (■). Evaluación estadística: ANOVA de dos factores, test de Bonferroni para comparaciones múltiples, $\alpha= 0,05$. La línea sólida horizontal indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos.

La administración del producto probiótico en la alimentación de los pollos durante 43 días no afectó la integridad de la mucosa intestinal (**Figura 33**) ya que no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los diversos grupos a lo largo de todo el ciclo de producción. Por lo tanto, esto es un resultado positivo ya que los microorganismos que conforman el producto probiótico no generaron un efecto adverso en las aves a nivel de la estructura intestinal. Una reducción de la conversión alimenticia,

del rendimiento y de la eficiencia en el procesado son algunas de las consecuencias de una mala integridad intestinal (Domínguez, 2015).



La **Figura 34** muestra que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el score de inflamación entre ambos tratamientos y el control al día 16 de vida de los animales. Sin embargo, a los días 30 y 43, se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos, donde el grupo al que se le administró probiótico tricepa 10^7 UFC/ml presentó menores valores respecto al grupo al que se le administró probiótico tricepa 10^5 UFC/ml. A los días 30 y 43, no hubo diferencias entre cada tratamiento y el control. Las **Figuras 33** y **34** corresponden a cortes histológicos y tinciones realizadas a partir de duodenos de pollos de los diferentes tratamientos al día 43 (**Figuras 35, 36** y **37**).



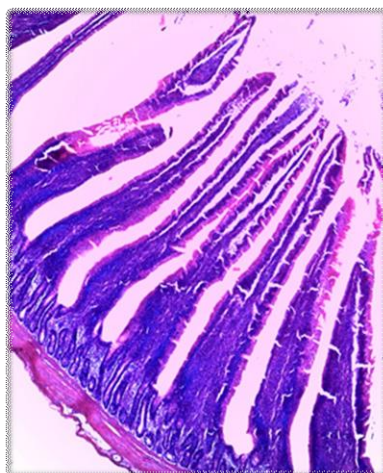


Figura 37. Corte transversal de duodeno teñido con hematoxilina y eosina, perteneciente a un pollo de 43 días de vida del grupo con producto probiótico tricepa 10^7 UFC/ml. La imagen está 50X.

Respecto al score de inflamación y pérdida de integridad, no se encontraron diferencias a lo largo del ensayo entre el grupo control y los tratados con el producto probiótico (en ninguna de las dos concentraciones), lo cual podría considerarse como un efecto positivo ya que los microorganismos que conforman el producto probiótico no generaron un efecto adverso en las aves. Las aves, cuya integridad intestinal está intacta, convierten mejor los nutrientes en energía, posibilitando un mayor mantenimiento de sus funciones y un crecimiento más eficiente.

Adicionalmente, se evaluó la relación vellosidad-cripta a lo largo del ciclo de producción en cada uno de los tratamientos (**Figura 38**), donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas al día 16 entre el grupo control y el grupo al que se le administró 10^7 UFC/ml del producto probiótico tricepa, el cual presentó la mayor relación vellosidad-cripta; mientras que la comparación entre el control y el tratamiento con el probiótico en concentración 10^5 UFC/ml a ese tiempo de crianza no arrojó diferencias estadísticamente significativas. Además, no se hallaron diferencias significativas en los otros días evaluados para ninguno de los tratamientos.

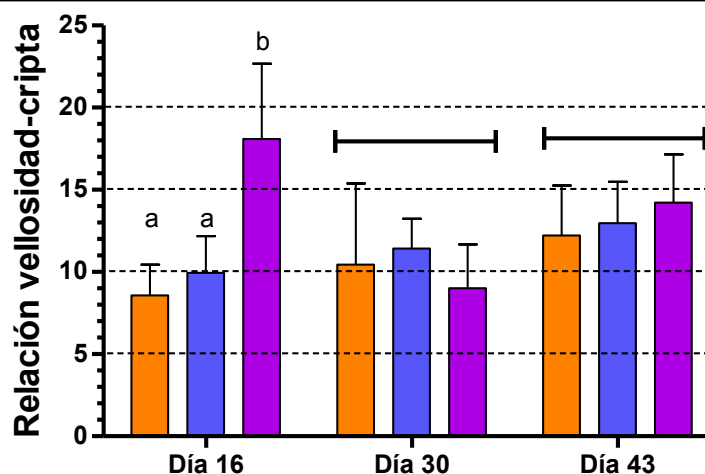


Figura 38. Relación vellosidad-cripta en duodenos de pollos de 16, 30 y 43 días de crianza en el grupo control (■), grupo con producto probiótico tricepa 10⁵ UFC/ml (■) y grupo tratamiento con producto probiótico tricepa 10⁷ UFC/ml (■). Evaluación estadística: ANOVA de dos factores, test de Bonferroni para comparaciones múltiples, $\alpha = 0,05$. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$). La línea sólida horizontal indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos.

Como se expresó anteriormente, el desarrollo de la morfología intestinal puede reflejar el estado de salud general del tracto gastrointestinal de los pollos. El consumo de probióticos puede generar, entre otras cosas, un aumento en la relación vellosidad-cripta con respecto a pollos que no consumen probiótico (Awad, 2006). Por ejemplo, Awad et al. (2008), observaron un aumento en la altura de las vellosidades del íleon respecto a la profundidad de las criptas en aves alimentadas con una dieta suplementada simbiótica (Biomín® PoultryStar); también observaron una mejora respecto al consumo de alimento y la absorción de nutrientes. Shokryazdan et al. (2017) evaluó el efecto del consumo de una mezcla probiótica compuesta por tres *L. salivarius* (1×10^9 UFC/ml), de origen aviar, durante un ciclo de crianza y halló que la relación vellosidad-cripta fue significativamente mayor en el grupo alimentado con la mayor concentración del probiótico (1 g / kg de alimento) respecto al grupo control al día 21, mientras que al día 42, los dos grupos tratados con probiótico mostraron un valor significativamente mayor respecto al grupo control.

Samanya & Yamauchi (2002) encontraron que la adición del probiótico *Bacillus subtilis* var. Natto en la dieta de las aves generó un aumento en la longitud de las vellosidades y una ligera mejora en la eficiencia alimentaria. Los mismos efectos se observaron cuando se adicionó *Enterococcus faecium* en el alimento de pollos broiler (Samli et al., 2007). De la misma manera, Correa Franco (2018) halló que el grupo de pollos al que le fue suministrado en el agua de bebida cepas probióticas aisladas de gránulo de kefir (junto a la microbiota total del gránulo) presentó un aumento en la relación vellosidad-cripta los días 21 y 28 de producción.

En este trabajo, el grupo tratado con el producto probiótico tricepa en concentración 10^7 UFC/ml fue el que obtuvo el mejor resultado en cuanto a la relación vellosidad-cripta al día 16 y presentó una diferencia estadísticamente significativa con el grupo control, aunque esta diferencia se pierde en los siguientes días evaluados. Este resultado resulta sumamente importante debido a que, en los pollos de engorde, la maduración del intestino delgado ocurre durante los primeros 10 días de vida. El área y el tamaño de las vellosidades aumentan rápidamente entre los dos primeros días de edad, y luego su tasa de crecimiento disminuye gradualmente, alcanzando una meseta entre 5 y 10 días después de la eclosión (Uni et al., 1996). Los cambios que ocurren en el intestino preparan a los pollitos para usar los nutrientes suministrados por la alimentación exógena, una vez consumido el vitelo (Uni et al., 1998).

Por lo tanto, este resultado indica que, tal como se dijo al inicio de esta sección, los pollos que consumieron el probiótico tricepa en concentración 10^7 tuvieron mayor superficie de absorción intestinal al menos hasta el día 16, favoreciendo la metabolización de los nutrientes lo que podría generar una mayor ganancia de peso.

3.3.4.1.4 Determinación de microorganismos en el contenido intestinal

Con el objetivo de detectar diferencias en la microbiota intestinal de los pollos, se determinó la concentración de bacterias lácticas, enterobacterias y *Clostridium* sp. en muestras de materia fecal, extraídas en condiciones de esterilidad de ciegos. Se utilizaron diferentes medios de cultivo para cada grupo bacteriano: MRS, Mac Conkey y TSC (Tryptosa Sulfito Cicloserina). Los recuentos se realizaron a partir de materia fecal de los pollos sacrificados el día 43 y los resultados se muestran en la **Tabla 28**.

Tabla 28. Concentración de bacterias lácticas, enterobacterias y *Clostridium* sp. (colonias presuntas positivas), obtenidas a partir de materia fecal extraída de ciegos de pollos de 43 días de vida. **

Pollo*	Tratamiento	MRS (UFC/ml)	Mac Conkey (UFC/ml)	TSC (UFC/ml)
1	Control	$5,0 \pm 1,3 \times 10^8$	$9,0 \pm 4,2 \times 10^7$	$3,1 \pm 0,1 \times 10^8$
2	Control	$2,3 \pm 0,4 \times 10^7$	$3,3 \pm 0,5 \times 10^6$	$3,1 \pm 0,9 \times 10^8$
3	Control	$1,1 \pm 0,1 \times 10^8$	$6,4 \pm 0,1 \times 10^6$	$3,0 \pm 2,3 \times 10^7$
4	Control	$4,0 \pm 0,3 \times 10^8$	$3,3 \pm 4,6 \times 10^6$	$1,7 \pm 0,1 \times 10^8$
5	10^5 UFC/ml	$1,3 \pm 0,1 \times 10^8$	$2,0 \pm 0,9 \times 10^5$	$2,2 \pm 0,4 \times 10^8$
6	10^5 UFC/ml	$4,9 \pm 1,3 \times 10^8$	$1,7 \pm 0,1 \times 10^8$	$3,4 \pm 0,5 \times 10^8$
7	10^5 UFC/ml	$2,7 \pm 1,8 \times 10^9$	$5,7 \pm 0,1 \times 10^8$	$> 10^9$
8	10^5 UFC/ml	$4,9 \pm 2,1 \times 10^8$	$1,6 \pm 0,4 \times 10^7$	$3,2 \pm 0,4 \times 10^8$
9	10^7 UFC/ml	$7,2 \pm 0,5 \times 10^8$	$2,3 \pm 0,5 \times 10^6$	$4,9 \pm 1,2 \times 10^8$
11	10^7 UFC/ml	$1,1 \pm 0,2 \times 10^8$	$5,7 \pm 0,1 \times 10^6$	$3,5 \pm 0,3 \times 10^8$
12	10^7 UFC/ml	$3,0 \pm 1,4 \times 10^8$	$6,7 \pm 0,5 \times 10^6$	$5,7 \pm 0,4 \times 10^6$

*Los valores son presentados de forma individual

** La muestra de materia fecal correspondiente al pollo 10 no pudo ser analizada debido a problemas de esterilidad al momento de la extracción de los ciegos.

En general, la concentración de bacterias lácticas estuvo en el orden de 10^8 en todos los grupos. Respecto a las enterobacterias, la mayor concentración se observó en los pollos tratados con el producto probiótico en concentración 10^5 UFC/ml (en el rango de 10^5 a 10^8 UFC/ml); mientras que los valores observados en los pollos con el tratamiento en concentración 10^7 UFC/ml y el control fueron similares (en el orden de 10^6 UFC/ml). La concentración de las colonias presuntas positivas de *Clostridium* sp. fue del orden de 10^8 UFC/ml para todos los grupos. Es importante mencionar que estos estudios se utilizan a menudo en el área de microbiología pero resultan exploratorios ya que se dificulta llegar a un resultado preciso debido a la variación de cada individuo. Se ha comenzado a trabajar con métodos moleculares en el laboratorio, realizando la puesta a punto de la técnica PCR en tiempo real para determinar la concentración de *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus plantarum*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Enterococcus* sp. en la materia fecal de los animales tratados con el producto probiótico tricepa (**Anexo 2**). Pedroso et al. (2013), utilizaron la técnica RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) para estudiar la microbiota de pollos alimentados con diferentes compuestos probióticos comerciales. Los resultados arrojaron que el recuento de coliformes en el contenido cecal se mantuvo en el rango 10^6 - 10^7 UFC/g para todos los probióticos evaluados en la dieta. Estos valores concuerdan con los obtenidos en esta Tesis en la determinación de enterobacterias en el tratamiento 10^7 UFC/ml y el control. Kim et al. (2011) evaluó el efecto en la microbiota

cecal del suministro de probióticos en la crianza de pollos broiler y al día 35 los recuentos de *Clostridium* sp. y coliformes en los grupos tratados con probióticos fueron menores respecto al grupo control ($p < 0,05$). Este resultado difiere con el obtenido en esta Tesis, donde la concentración de *Clostridium* sp. estuvo en el mismo orden tanto para el grupo control como para los tratamientos.

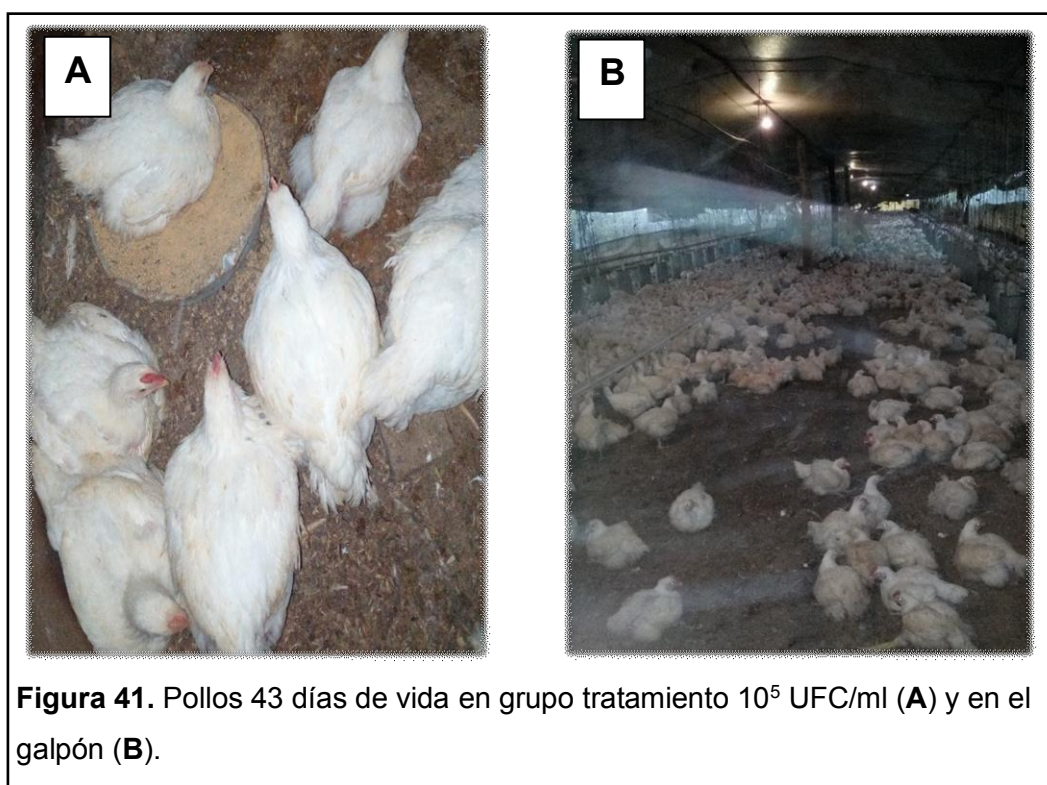
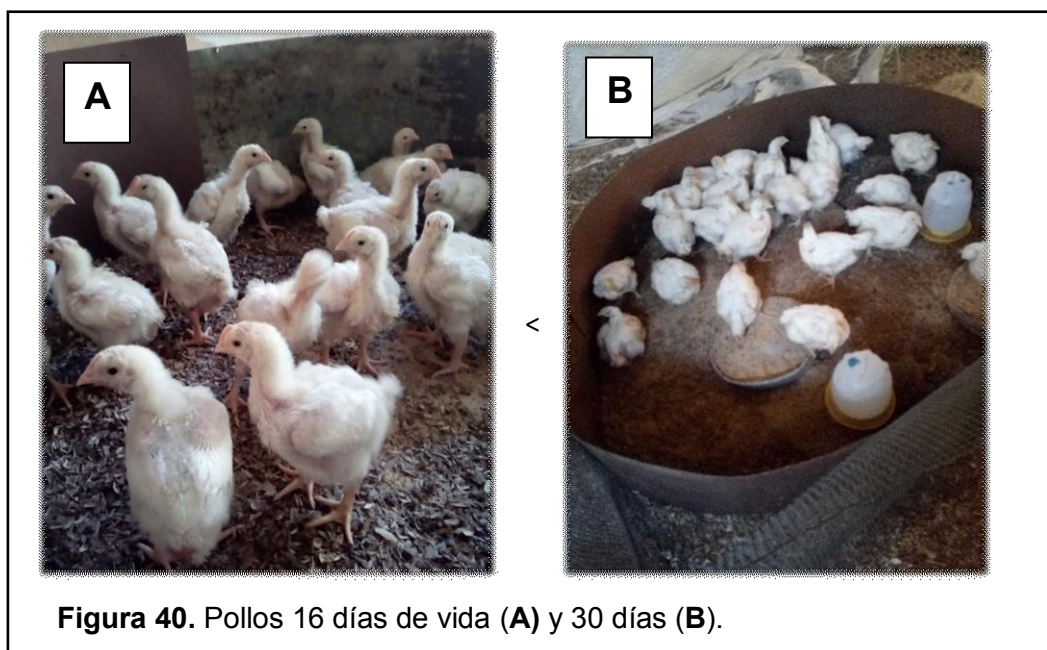
Por consiguiente, utilizando la metodología clásica de recuento en placa fue difícil obtener un resultado concluyente sobre las concentraciones bacterianas principalmente por la variación encontrada entre individuos dentro de un mismo grupo. Por esta razón es que se comenzó a trabajar con la técnica de PCR en tiempo real, una técnica que nos permitirá determinar de manera más precisa los diferentes géneros y cantidades de los mismos (**Anexo 2**).

3.3.4.1.5 Pesaje de animales

Uno de los parámetros productivos que se determinan a la hora de evaluar el efecto de la administración de microorganismos probióticos en la producción es el peso adquirido por los animales al finalizar el ciclo de crianza. A modo ilustrativo, se presentan fotos de los animales a lo largo del ciclo de producción (**Figuras 39, 40 y 41**).



Figura 39. Pollos recién llegados (A) y con 8 días de vida (B).



Los resultados se expresan como el peso promedio a partir del pesaje de un grupo de pollos por día (**Figura 42**). En este caso, se tuvo en cuenta el pesaje de los animales del resto del galpón para utilizarlos como grupo de referencia. Los datos para confeccionar la figura se presentan en la **Tabla 29**.

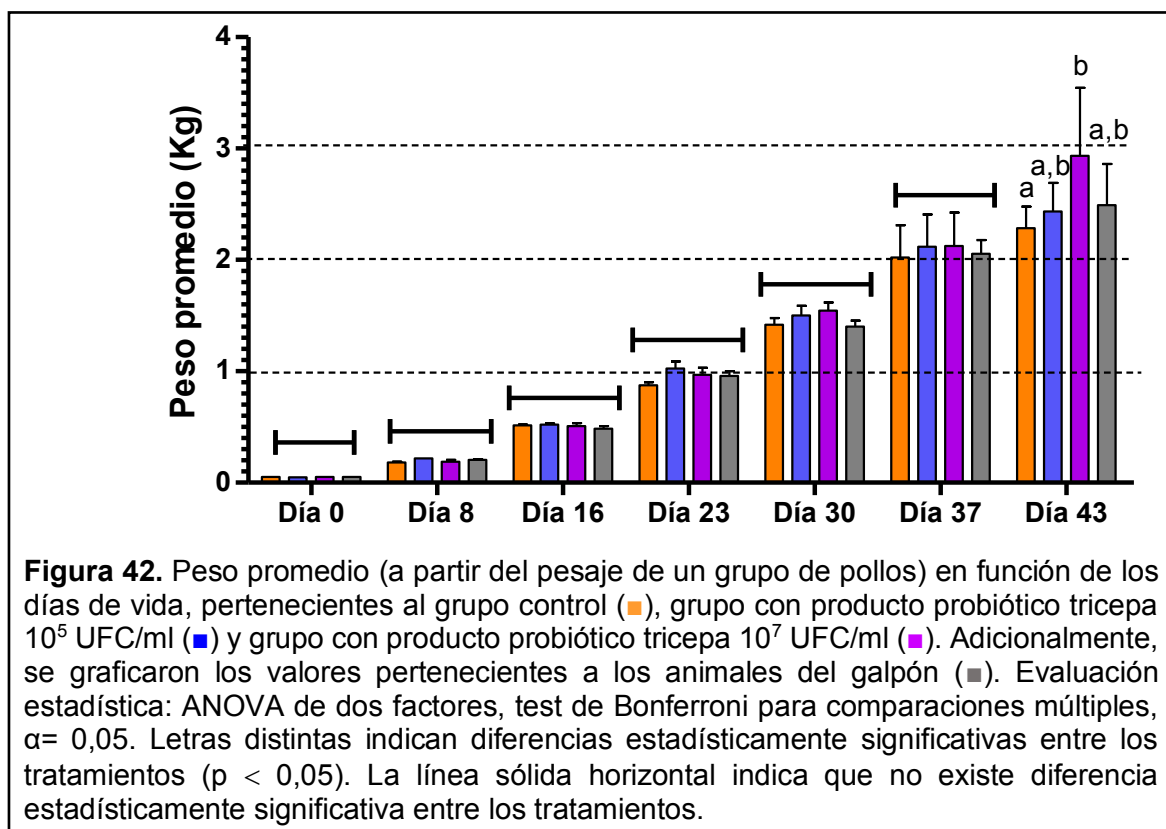


Tabla 29. Peso promedio por pollo a lo largo de un ciclo completo de crianza. *

Edad del animal (días)	Peso por pollo promedio (Kg)			
	Grupo Control	Tratamiento 10 ⁵ UFC/ml	Tratamiento 10 ⁷ UFC/ml	Galpón
0	0,0505	0,0498	0,0500	0,0503
8	0,1820 ± 0,0064	0,2170 ± 0,0007	0,1885 ± 0,0169	0,2055 ± 0,0057
16	0,5130 ± 0,0078	0,5230 ± 0,0099	0,5090 ± 0,0262	0,4842 ± 0,0244
23	0,8733 ± 0,0272	1,0265 ± 0,0615	0,9685 ± 0,0615	0,9570 ± 0,0438
30	1,398 ± 0,0548	1,4907 ± 0,0631	1,5117 ± 0,0771	1,4703 ± 0,1243
37	2,038 ± 0,2065	2,1730 ± 0,2274	2,2150 ± 0,2627	2,0656 ± 0,0913
43	^a 2,202 ± 0,2002	^{a, b} 2,3341 ± 0,2518	^b 2,7189 ± 0,5707	^{a, b} 2,4497 ± 0,2710

*Evaluación estadística: ANOVA de dos factores, test de Bonferroni para comparaciones múltiples, α= 0,05. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (p < 0,05).

Hasta el día 37 de crianza no hubo diferencias estadísticamente significativas en el peso promedio de los animales, indistintamente del grupo/tratamiento evaluado. Sin embargo, a los 43 días de vida, el mayor valor se obtuvo en el grupo con probiótico tricepa 10⁷ UFC/ml, el cual se diferenció significativamente del grupo control.

El peso promedio obtenido del grupo control no demostró diferencias significativas respecto a los animales del galpón y los del tratamiento 10⁵ UFC/ml. Tampoco se hallaron diferencias entre los pesos promedios de los tratamientos.

De acuerdo a lo establecido por Cobb Cares™ (2018), los pesos esperados de acuerdo a la edad del animal durante la crianza son:

EDAD (DÍAS)	PESO HEMBRA (KG)	PESO MACHO (KG)	PROMEDIO (KG)
0	0,042	0,042	0,042
7	0,191	0,194	0,192
14	0,521	0,534	0,527
21	0,995	1,042	1,018
28	1,554	1,675	1,614
35	2,153	2,392	2,272
42	2,757	3,147	2,952

Al comparar los valores de referencia promedio con los obtenidos en esta Tesis, se observó que la tendencia de peso fue similar a la obtenida durante el ciclo de crianza con el tratamiento 10^7 UFC/ml. Respecto al resto de los grupos, los valores alcanzados estuvieron generalmente por debajo de los de referencia.

En coincidencia con este trabajo, ciertos autores informaron que los índices de rendimiento de los pollos de engorde mejoraron mediante la adición de diferentes concentraciones de una leche fermentada probiótica como es el kefir (Cenesiz et al., 2008; Cho et al., 2013; Toghyani et al., 2015). Jin et al. (2000) estudiaron el efecto de la combinación de *Lactobacillus acidophilus* I26 y una mezcla de 12 lactobacilos sobre el crecimiento de pollos parrilleros, comprobando que la ganancia de peso fue superior en los pollos tratados con probióticos respecto del grupo sin tratar. De acuerdo al estudio de Shokryazdan et al. (2017), la administración de un probiótico compuesto por tres *L. salivarius* (10^9 UFC/ml) durante un ciclo completo de crianza resultó en un aumento significativo de peso respecto al grupo control, coincidiendo con los resultados observados en esta Tesis para los pollos que consumieron el producto probiótico tricepa en concentración 10^7 UFC/ml.

Sin embargo, otros autores no han encontrado diferencias en los pesos. De acuerdo a Correa Franco (2018), no se encontró diferencia en la ganancia de peso de los animales que fueron alimentados con una mezcla probiótica compleja (conformada por bacterias aisladas de gránulo de kefir y la microbiota completa del gránulo) con respecto al control. De igual forma, en otras investigaciones no se hallaron diferencias en las variables productivas en pollos parrilleros que consumieron probióticos (Rocha et al., 2010; Olnood et al., 2015; Salehimanesh et al., 2016). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los parámetros productivos, tales como el peso y la ganancia diaria de peso, dependen de muchas variables, entre las que se pueden mencionar: la concentración del probiótico, la vía de administración, la composición del alimento, el ambiente en el que se encuentran los animales, el sexo, entre otras. Esto dificulta realizar comparaciones.

De acuerdo a lo observado previamente en el análisis histopatológico del duodeno (**Sección 3.3.4.1.3**), la relación vellosidad/cripta fue significativamente mayor al día 16 de crianza en el grupo tratamiento 10^7 UFC/ml, respecto al otro tratamiento y al grupo control. A mayor valor de este parámetro, mayor es la superficie destinada a la absorción de nutrientes lo cual podría influir en el aumento de peso. Esto se podría relacionar con que, al finalizar el ciclo de crianza (día 43), el peso del tratamiento 10^7 UFC/ml fue significativamente mayor ($2,7189 \pm 0,5707$ kg) respecto al peso del grupo control ($2,202 \pm 0,2002$ kg) (**Tabla 29**). No se observaron diferencias para el caso del tratamiento 10^7 UFC/ml con los pollos del galpón y los del tratamiento 10^5 UFC/ml.

De acuerdo a diferentes estudios reportados en relación al uso de probióticos en producción aviar, el efecto sobre los parámetros productivos (como la ganancia de peso) no es el único resultado que se busca obtener. La dieta debe tener como funciones principales, no solo proporcionar suficientes nutrientes para cumplir con los requisitos metabólicos del cuerpo, sino también modular diversas funciones del cuerpo (Alkhalif & Alhaj, 2010; Blajman et al., 2014). A continuación, se analizó si los probióticos tenían efecto sobre otros parámetros fisiológicos de los animales.

3.3.4.1.6 Determinación de parámetros bioquímicos en suero

En general, el examen de sangre se realiza para determinar la salud general de los individuos (Simaraks et al., 2004). A partir del suero se determinaron las proteínas totales, albúmina, urea y creatinina. También se determinaron los niveles de diversas enzimas hepáticas y el contenido de colesterol total y de triglicéridos (**Tabla 30**).

Tabla 30. Parámetros bioquímicos obtenidos a partir de sangre de pollos de diferentes días de vida, a lo largo del ciclo de crianza.

Parámetros	16 días			30 días			43 días		
	Control	10 ⁵	10 ⁷	Control	10 ⁵	10 ⁷	Control	10 ⁵	10 ⁷
Urea (mg/dl)	11 ± 2	11 ± 2	9 ± 2	8 ± 0	10 ± 1	10 ± 0,2	6 ± 1	7 ± 2	7 ± 2
Colesterol (mg/dl)	93 ± 23	174 ± 3 1	175 ± 2	115 ± 7	100 ± 12	103 ± 0,4	105 ± 0,5	116 ± 45	115 ± 10
Creatinina (mg/dl)	0,425 ± 0,025	0,43 ± 0,02	0,37 ± 0,18	0,35 ± 0,07	0,39 ± 0,02	0,26 ± 0,5	0,34 ± 0,3	0,38 ± 0	0,43 ± 0,5
Proteínas totales (g/dl)	3,3 ± 0,3	3,1 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,5 ± 0,3	2,8 ± 0,3	3,7 ± 0,7	3,6 ± 0,5	3,6 ± 0,4	3,3 ± 0,1
Triglicéridos (mg/dl)	39,5 ± 18,5	35 ± 4	45,5 ± 8,5	26 ± 10	49 ± 24	45,5 ± 17,5	50 ± 1	48 ± 21	50 ± 12
GOT (U/l)	-*	-*	255 ± 15	262 ± 29	291 ± 30	263 ± 0	320 ± 0,3	279 ± 43	310 ± 20
GPT (U/l)	7	-*	-*	3	-*	-*	0	0	-*
GGT (U/l)	20 ± 1	19 ± 3	-*	20 ± 3	21 ± 0	-*	33 ± 10	26 ± 5	25 ± 5
TGO (U/l)	140 ± 54	70 ± 37	239 ± 70		37 ± 70	128 ± 41	-*	70 ± 37	498 ± 289
TGP (U/l)	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	1	-*
Albúmina (g/dl)	-*	1,3 ± 0,5	1,4 ± 0,3	1,4 ± 0,6	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,5	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,2

Referencias: GOT (AST: aspartato aminotransferasa), GPT (ALT: alanino aminotransferasa), GGT (gamma glutamiltranspeptidasa), TGO y TGP son enzimas hepáticas; FAL (fosfatasa alcalina). U/l: Unidades Internacionales por litro. Valores bibliográficos de referencia: colesterol (mg/dl) = 143±18; proteínas totales (g/dl) = 3,86±0,45; triglicéridos= 53±27; albúmina (g/dl) = 1,59±0,33.

-*: no fue posible detectar los valores debido al límite de detección del equipo.

De acuerdo a los datos obtenidos, no se encontraron diferencias en el nivel de proteínas totales entre el grupo control y los tratamientos con probióticos en los días evaluados. Este parámetro se utiliza para evaluar el estado nutricional; su valor puede elevarse en el caso de una enfermedad hepática crónica, o puede estar disminuida en casos de gastroenteropatías (por pérdida) y malnutrición (Hasan et al., 2015). Tampoco se observaron cambios o disminución en los niveles de creatinina y urea en respuesta al producto probiótico tricepa; estas dos pruebas son las más utilizadas para diagnosticar y controlar la enfermedad renal en patología clínica humana y animal ya que su presencia en alta concentración es un indicio de daños renales (Del Bianchi et al., 2005; Hashem & Mohamed, 2009). Estas moléculas se eliminan casi por completo mediante filtración glomerular de modo que, en el caso de la insuficiencia renal, su concentración plasmática aumenta (Braun & Lefebvre, 2008; Fernández et al., 1994; Lopez-Giacoman & Madero, 2015). La creatinina es un metabolito endógeno que proviene del metabolismo muscular y su eliminación o excreción es muy constante. La urea es el principal producto nitrogenado del catabolismo de las proteínas y es menos específica que la creatinina. El hígado tiene un papel esencial en el metabolismo de los nutrientes; en desintoxicación y excreción de metabolitos hidrófobos y xenobióticos; en la síntesis de la mayoría de las proteínas plasmáticas; y en la digestión a través de la síntesis, la

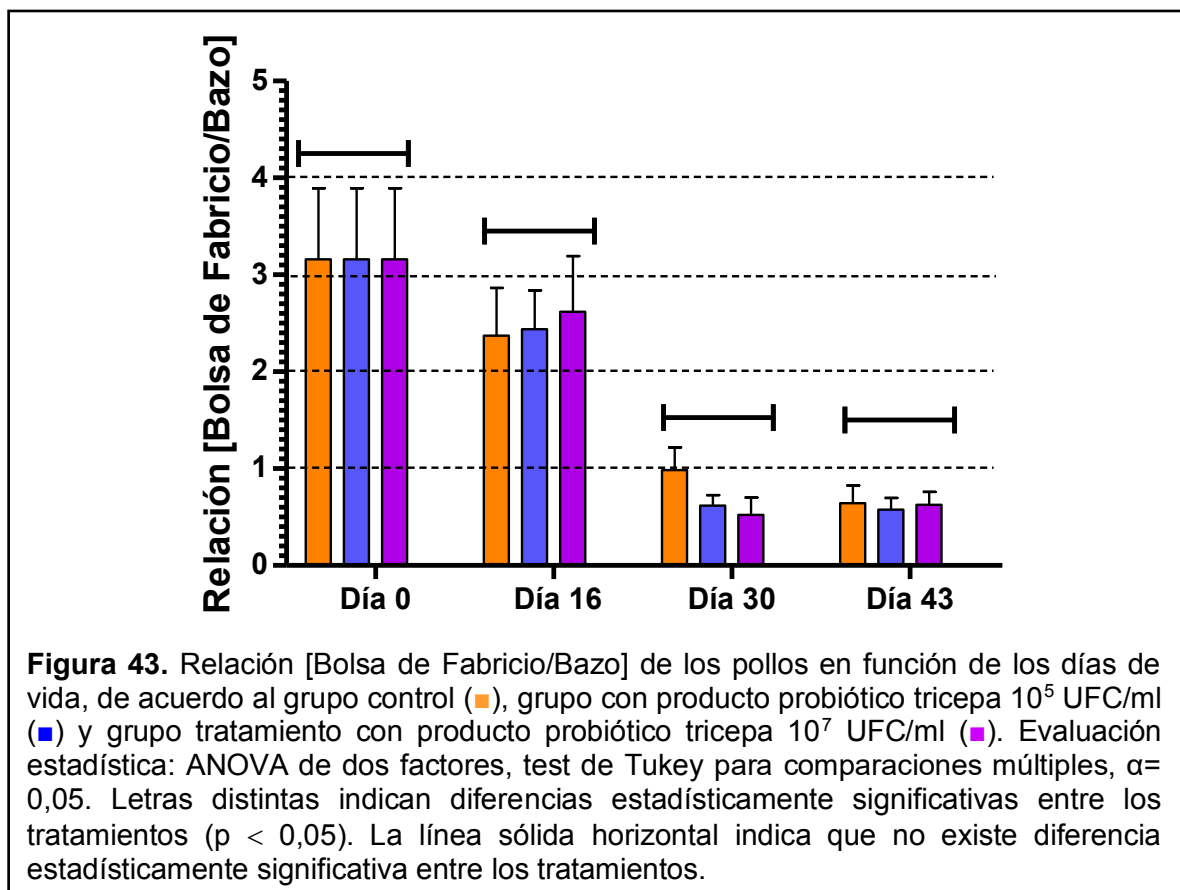
secreción biliar y la conservación de los ácidos biliares que son esenciales tanto para la digestión como para la absorción intestinal de grasas y otros lípidos, incluidas las vitaminas liposolubles (Tennant & Center, 2008). La presencia de enfermedad hepática a menudo se reconoce en base a actividades séricas elevadas de enzimas de origen hepático, p. ej., AST, ALT y GGT (Tennant & Center, 2008). Los valores aumentados de AST, ALT, globulina y albúmina dan una idea del daño hepático (Gowda et al., 2009). Además, la enfermedad hepatocelular causa una disminución en la proteína sérica porque el hígado es el sitio exclusivo de la síntesis de albúmina, la proteína plasmática más abundante (Tennant & Center, 2008). En este estudio, no fue posible determinar las actividades de las enzimas mencionadas en todos los días de sacrificio debido al límite de detección que posee el espectrofotómetro que se utilizó para las determinaciones.

El análisis de los parámetros sanguíneos resultó muy complejo debido a la grandes desviaciones encontradas en algunas determinaciones. Sumado a esto, es muy difícil encontrar valores de referencia confiables para las pollos debido a las múltiples variables. Sin embargo, comparando el control con ambos tratamientos, podemos observar que los pollos no presentaron ningún tipo de patología o efecto sistémico que pudiera evidenciarse en el suero. Lo resultados demostraron que la administración del producto probiótico fue inocua para las aves en las dos concentraciones evaluadas.

3.3.4.1.7 Pesaje de bolsa de Fabricio y bazo

Las bacterias probióticas, especialmente las bacterias lácticas, y los metabolitos producidos en la fermentación, originan cambios en la población microbiana intestinal y, a su vez, estimulan el sistema inmune (Higgins et al., 2007b), lo cual puede verse reflejado en el aumento de peso de órganos relacionados con este sistema. Desde hace varios años se ha documentado la relación directa que hay entre el crecimiento del bazo y de la bolsa de Fabricio en pollos broiler, hasta las 3-4 semanas de edad, momento en que el tamaño de la bolsa de Fabricio es claramente mayor que el del bazo (Morales & Boclair, 1993). A partir de ese momento, mientras que el bazo sigue creciendo, la bolsa de Fabricio, en condiciones normales de campo, parece involucionar. Al finalizar el ciclo normal (7 semanas de edad), su tamaño es claramente menor que el del bazo. Es decir, la bolsa de Fabricio adquiere su mayor tamaño en las aves jóvenes y luego se atrofia hasta desaparecer o quedar reducida a vestigios, disminuyendo la relación bolsa de Fabricio/bazo.

Para analizar qué efecto tienen los tratamientos con ambas concentraciones de probiótico, se evaluó el peso de estos dos órganos ya que, al ser órganos linfoides, un aumento en sus tamaños podría ser indicio de una infección o patología (García-Hernández et al., 2016). La relación entre los pesos a lo largo del ciclo productivo se presenta en la **Figura 43**.



No se encontraron diferencias significativas en la relación [Bolsa de Fabricio/Bazo] entre el grupo control y los tratamientos con el producto probiótico tricepa a lo largo de todo el ciclo de crianza. Estos resultados son de gran valor debido a que estos órganos están directamente relacionados con el sistema inmune (Oláh et al., 2013), lo cual indicaría que los probióticos no generan un estímulo inmunológico que afecte la relación del peso de dichos órganos. Esto concuerda con lo encontrado por Salarmoini & Fooladi (2011), donde la administración de *Lactobacillus acidophilus* en el agua de bebida de pollos parrilleros no presentó diferencias significativas en los pesos de bazo y bolsa de Fabricio respecto al grupo control. De la misma manera, Cho et al. (2013) y Correa Franco (2018) no evidenciaron diferencias en esta relación cuando estudiaron pollos que consumieron kefir durante la crianza.

En conclusión, la administración del producto probiótico tricepa, a lo largo del ciclo de producción, no presentó diferencias en el peso del bazo y de la bolsa de Fabricio en comparación con el grupo control.

3.3.4.1.8 Conclusiones del 1° ensayo

A partir de las determinaciones realizadas en este primer experimento, se puede concluir que la administración del producto probiótico tricepa conformado por los aislados *L. salivarius* CM-CIDCA 1234C, *L. agilis* CM-CIDCA 1235C y *Enterococcus* sp. 2, en concentración 10^5 UFC/ml y 10^7 UFC/ml, resultó ser inocuo para los pollos durante todo el ciclo de crianza. Respecto a las concentraciones evaluadas, el tratamiento con el producto probiótico 10^7 UFC/ml alcanzó el mayor valor en cuanto a la relación vellosidad-cripta a los 16 días de vida y a la ganancia de peso al finalizar el ciclo productivo, en comparación con el grupo control. Estos dos parámetros están íntimamente relacionados ya que, al aumentar la longitud de las vellosidades, se incrementa la superficie disponible para absorber nutrientes.

A partir de estos resultados, se decidió realizar otro experimento donde se repitió el tratamiento con el producto probiótico tricepa en concentración 10^7 UFC/ml y, a fin de incluir una mayor variedad de cepas en el estudio del efecto de los probióticos en la producción aviar, se estudió la acción de *L. plantarum* CIDCA 83114. Como se mencionó en otro capítulo, esta cepa fue aislada del gránulo de kefir (Garrote et al., 2001) y ha sido extensamente estudiada en el grupo de investigación de bacterias lácticas debido a sus propiedades probióticas y tecnológicas (Garrote, 1999; Golowczyc et al., 2009; Kakisu et al., 2012, Moretti et al., 2018). Adicionalmente, esta cepa fue utilizada como referencia en algunos ensayos de esta Tesis y ha sido transferida para su desarrollo y comercialización como producto probiótico para la crianza de animales. Por lo tanto, en este segundo ensayo *in vivo* se evaluaron, además del producto probiótico tricepa (10^7 UFC/ml), dos concentraciones de *L. plantarum* CIDCA 83114: 10^5 UFC/ml y 10^8 UFC/ml (que resulta según la Tabla de consumo mencionada en la **Sección 3.3.4.1.5** en 10^4 - 10^6 y 10^7 - 10^9 UFC/pollo/semana, respectivamente).

3.3.4.2 Administración del producto probiótico a pollos parrilleros: 2° ensayo

El total de animales al inicio del ensayo fue de 112 pollitos BB, con un peso promedio de 46,8 g, el cual es un valor relativamente aceptable, teniendo en cuenta que el peso promedio entre las 0 y 24 horas de vida debe estar dentro del rango entre 42 y 63 g (Cobb Cares™, 2018). Todos los animales se dividieron en 4 tratamientos (grupos), de 28 animales cada uno. Los grupos evaluados fueron los siguientes:

Tratamiento 1: la concentración final del producto probiótico tricepa en el agua de bebida fue de **10⁷ UFC/ml**. Este grupo se identificó con el color **violeta**.

Tratamiento 2: la concentración final del probiótico *L. plantarum* CIDCA 83114 en el agua de bebida fue de **10⁵ UFC/ml**. Este grupo se identificó con el color **rojo**.

Tratamiento 3: la concentración final del probiótico *L. plantarum* CIDCA 83114 en el agua de bebida fue de **10⁸ UFC/ml**. Este grupo se identificó con el color **verde**.

Grupo control: no se les administró producto probiótico, sólo leche estéril diluida en el agua de bebida. Este grupo se identificó con el color **naranja**.

Al inicio del ensayo, se eligieron al azar otros 2 pollitos BB, los cuales fueron inspeccionados a simple vista y sacrificados. La necropsia no demostró presencia de alteraciones en los animales. Los sacrificios se realizaron los días 0, 16, 32 y 44 de vida. La temperatura promedio durante el experimento fue 12 °C, por lo que se debió calefaccionar el ambiente durante toda la crianza: sin embargo, las diferencias de temperaturas registradas entre los tratamientos fueron significativas debido a su disposición en el galpón (**Figuras 44 y 45**). Por ejemplo, al día 29, las temperaturas en el sector del tratamiento con el probiótico tricepa 10⁷ UFC/ml, *L. plantarum* 10⁸ UFC/ml, *L. plantarum* 10⁵ UFC/ml y el grupo control fueron 13,6 °C, 16,2 °C, 14 °C y 16 °C, respectivamente; mientras que la temperatura en el resto del galpón fue 18 °C. Se debe tener en cuenta esta variación térmica ambiental entre los animales del ensayo respecto a los que estaban alojados en el galpón. Según lo expresado por el Vet. Jorge Venturino (Gerente técnico área Avicultura en Biofarma SA), los pollitos recién nacidos no tienen casi tejido adiposo marrón y, además, poseen gran parte de su musculatura formada por fibras blandas (pechuga), situación que los lleva a que no puedan producir calor por temblor. Esto les genera una gran dependencia de una fuente externa de calor para mantener su temperatura corporal (Macari et al., 1994). La capacidad de termorregulación recién se desarrolla entre los 10 a 15 días de vida, lo que hace que las aves disminuyan sus requerimientos de temperatura ambiente de 35 °C al nacer, a 24 °C a los 28 días y a 21 °C a los 42 días (Silva y Nass, 2004). En situaciones donde la temperatura ambiente se encuentra por debajo de la requerida, los animales responden de acuerdo a patrones comportamentales con agrupamientos, inmovilidad, abatimiento y, en casos extremos, postración bajo la fuente de calor, deshidratación y muerte; además de afectar su rendimiento productivo al final del ciclo.

Se realizaron tres sacrificios a lo largo del ciclo de producción: a los 16, 32 y 44 días.

3.3.4.2.1 Disposición de los animales respecto al galpón

Debido al aumento de tamaño de los animales, se debió modificar el tamaño y disposición de los corrales en el transcurso de la producción, siendo una distribución entre el día 0 y el día 32 (**Figura 44**) y otra diferente, desde el día 33 hasta el final de la producción (**Figura 45**).

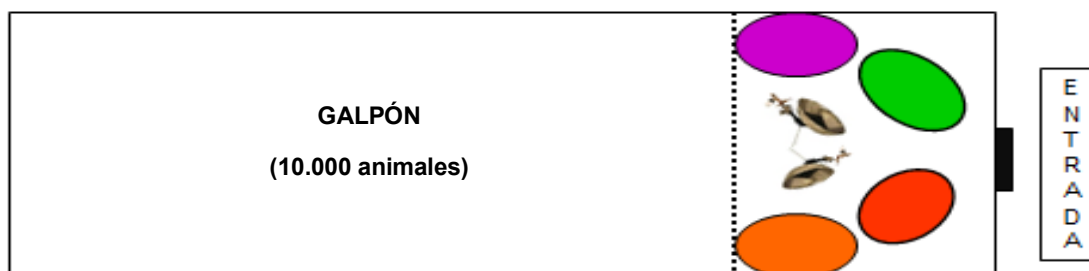


Figura 44. Disposición de los grupos/tratamientos durante los primeros 32 días de vida de los animales, donde cada círculo corresponde a los corrales de grupo control (■), tratamiento con producto probiótico tricepa 10⁷ UFC/ml (■), tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10⁵ UFC/ml (■) y tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10⁸ UFC/ml (■). Las líneas punteadas corresponden a la cortina plástica que separa los animales del ensayo del resto de los animales del galpón. Se muestra la posición de las lámparas.

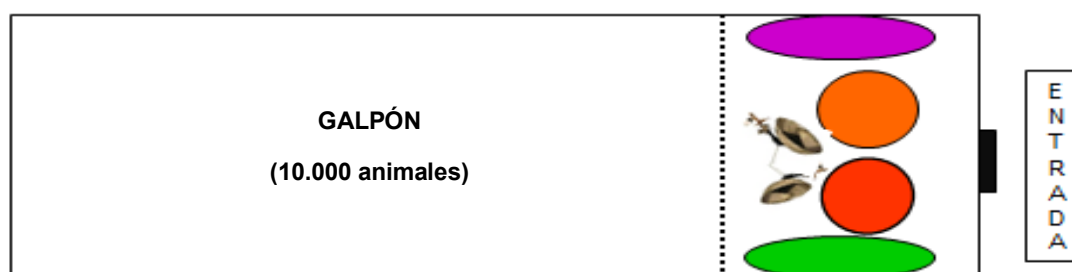


Figura 45. Disposición de los grupos/tratamientos desde el día 33 hasta finalizar el ciclo de producción, donde cada círculo corresponde a los corrales del grupo control (■), tratamiento con producto probiótico tricepa 10⁷ UFC/ml (■), tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10⁵ UFC/ml (■) y tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10⁸ UFC/ml (■). Las líneas punteadas corresponden a la cortina plástica que separa los animales del ensayo del resto de los animales del galpón. Se muestra la posición de las lámparas.

A partir del día 33 los corrales de los tratamientos con producto probiótico tricepa 10⁷ UFC/ml y con *L. plantarum* CIDCA 83114 10⁸ UFC/ml fueron armados cercanos a los costados del galpón (**Figura 45**). Esta situación fue desfavorable para estos tratamientos ya que la separación con el medio ambiente (temperatura ambiente aproximada de 12 °C) estaba mediada por alambres y cortinas plásticas. En

consecuencia, en esas zonas fue más difícil alcanzar la temperatura adecuada para el crecimiento de los animales, la cual debe estar dentro del rango de 21 - 24°C.

3.3.4.2.2 Inspección general y necropsias

El estado sanitario general de los pollos fue bueno, no observándose alteraciones en las necropsias a lo largo de todo el ciclo de crianza. Se notó una importante disparidad en el tamaño de los animales, lo que podría ser compatible con estrés térmico (Pantoja-Estrada, 2014).

3.3.4.2.3 Determinación del contenido de materia grasa total en hígado

Una de las consecuencias de la producción intensiva de pollos broiler es el aumento en la grasa corporal, con la consiguiente aparición de enfermedades relacionadas. La generación excesiva de lípidos hepáticos en el pollo puede causar esteatosis (acumulación de lípidos en las células hepáticas) y síndrome hemorrágico del hígado graso (Fat Liver Hemorrhagic Syndrome, FLHS), que se caracteriza por obesidad, disminución aguda de la producción de huevos en ponedoras y muerte súbita por daño hepático y hemorragia (He et al., 2014; Liang et al., 2015; Wolford & Polin, 1972). En condiciones normales, el hígado de las aves no debe presentar cambios en su composición lipídica, con excepción de las primeras semanas de vida donde, después de eclosionar, se movilizan lípidos desde el saco vitelino, teniendo un aspecto macro y microscópico de tipo graso (Cunningham & Klein, 2014).

El uso de probióticos que logren disminuir la grasa hepática puede ser beneficioso en la producción intensiva de pollos, ya que podría evitar la aparición de las enfermedades mencionadas anteriormente. De acuerdo a Correa Franco (2018), el consumo de microorganismos probióticos, obtenidos a partir de la fermentación del kefir, disminuyó significativamente el contenido de materia grasa en el hígado de los pollos, respecto al grupo control. Con este antecedente, se evaluó, si el consumo de los diferentes probióticos estudiados generaba el efecto mencionado en los animales.

Para ello, se estudió el contenido de materia grasa total en los hígados de los pollos al final del ciclo de producción. Después del sacrificio, los órganos fueron recolectados en condiciones de esterilidad, se pesaron y se conservaron congelados hasta la determinación del contenido graso.

A continuación, se presentan los resultados en la **Figura 46**. La tabla utilizada para confeccionar esta figura se presenta en la **Sección 2 del Apéndice 2**.

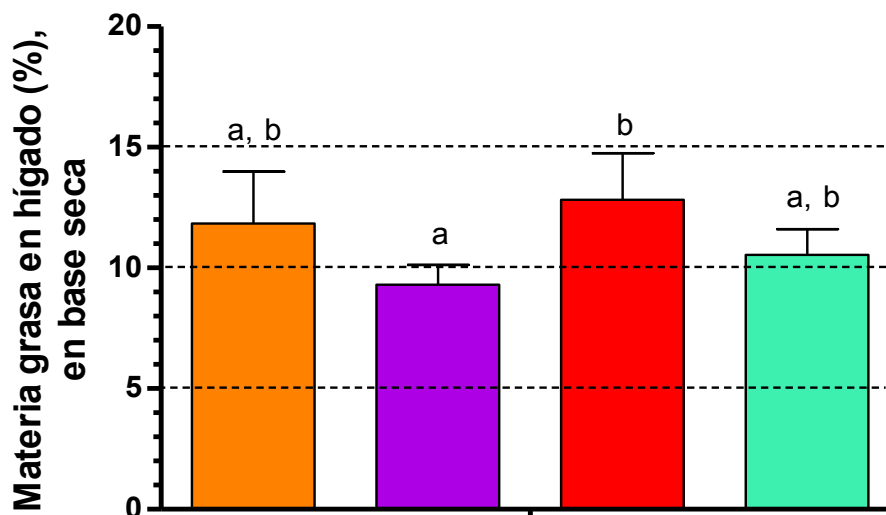


Figura 46. Determinación de materia grasa total (% en base seca*) en hígados de pollos al final del ciclo de crianza (44 días de vida) en el grupo control (■), tratamiento con producto probiótico tricepa 10⁷ UFC/ml (■), tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10⁵ UFC/ml (■) y tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10⁸ UFC/ml (■). Evaluación estadística: ANOVA de un solo factor, test de Tukey para comparaciones múltiples, $\alpha = 0,05$. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los aislados tratamientos ($p < 0,05$). * %, en base seca: contenido de materia grasa determinado por método de extracción con solventes, en relación al peso seco del órgano.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y los grupos tratados. Sin embargo, se halló diferencia significativa entre el tratamiento con el producto probiótico tricepa 10⁷ UFC/ml y con *L. plantarum* CIDCA 83114 10⁵ UFC/ml, alcanzando un % de materia grasa más bajo con el producto tricepa (**Figura 46**).

Estos resultados indican que el consumo de los probióticos evaluados en esta Tesis no logró disminuir la materia grasa total del hígado respecto al grupo que no consumió probióticos.

3.3.4.2.4 Análisis histopatológico de intestino

De acuerdo a la **Sección 3.2.5.5.2**, se tomó una muestra representativa de los duodenos de cada animal a lo largo del ciclo productivo y se evaluaron los parámetros relacionados con la salud intestinal: pérdida de integridad y score de inflamación de la mucosa intestinal y relación vellosidad/cripta.

Al igual que lo ocurrido con los resultados de algunas determinaciones realizadas en el 1° ensayo *in vivo* (como en la **Sección 3.3.4.1.4** "Determinación de los microorganismos

en el contenido intestinal”), los valores de DE fueron altos. Esto se debe a que los resultados son calculados a partir del promedio de 4 animales con una amplia variabilidad entre individuos. Esta condición viene aparejada de realizar experimentos en condiciones de producción reales, con animales no provenientes de bioterio y en un ambiente difícil de controlar, como lo es una granja avícola.

De acuerdo a lo expresado en el **Inciso B**, de la **Sección 3.2.4.4.2 (Materiales y Métodos)**, se clasificó la pérdida de integridad (**Figura 47**) y el score de inflamación (**Figura 48**) de acuerdo a los puntajes asignados al estado de la mucosa. Estos parámetros fueron evaluados a los días 16, 32 y 44 en duodenos de los animales del grupo control y los tratamientos con el producto probiótico tricepa 10^7 UFC/ml, tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10^5 UFC/ml y tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10^8 UFC/ml.

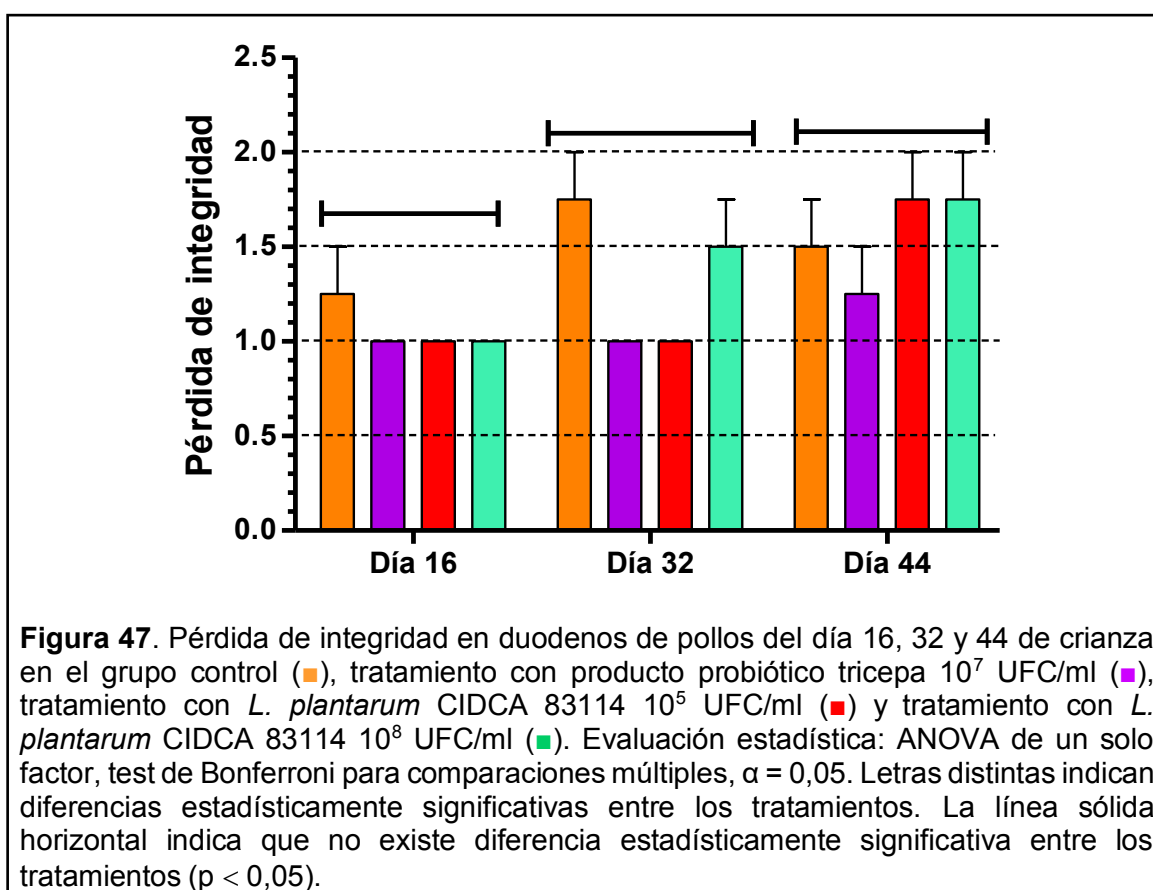
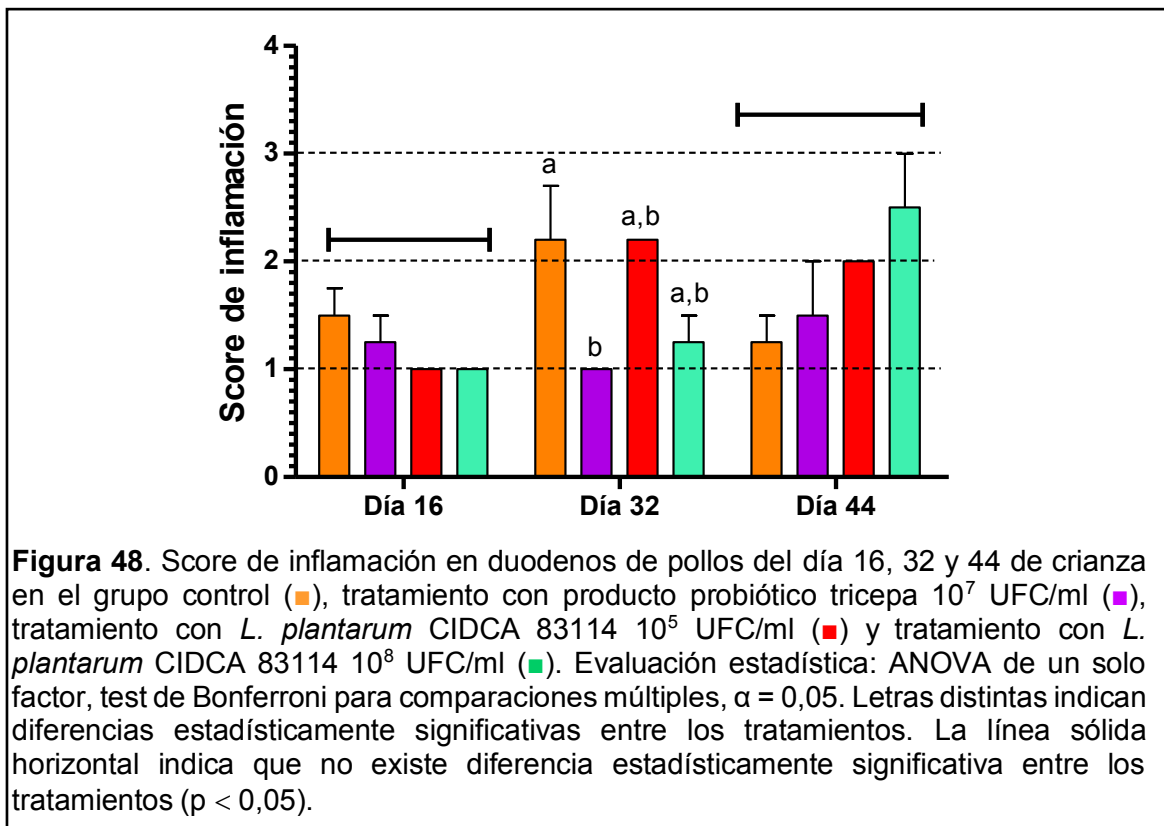


Figura 47. Pérdida de integridad en duodenos de pollos del día 16, 32 y 44 de crianza en el grupo control (■), tratamiento con producto probiótico tricepa 10^7 UFC/ml (■), tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10^5 UFC/ml (■) y tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10^8 UFC/ml (■). Evaluación estadística: ANOVA de un solo factor, test de Bonferroni para comparaciones múltiples, $\alpha = 0,05$. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. La línea sólida horizontal indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($p < 0,05$).

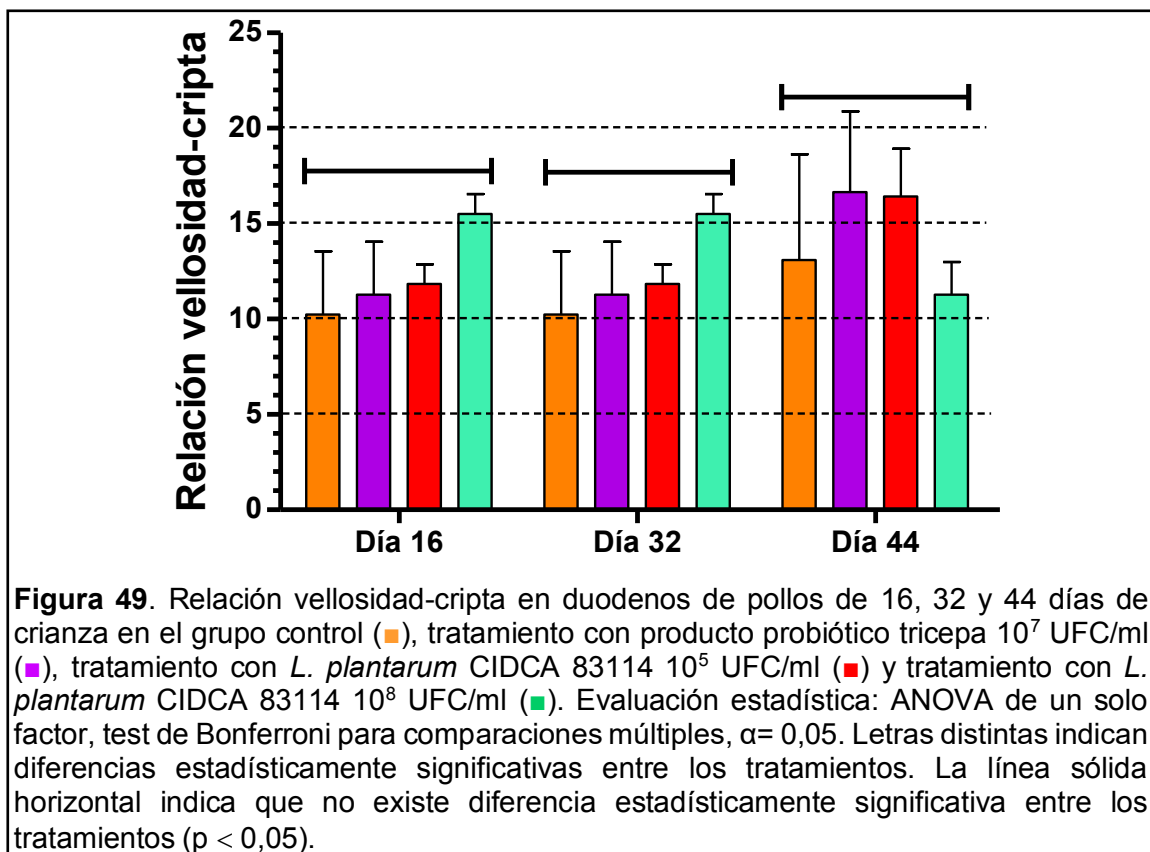
A lo largo del ciclo de producción, el score de integridad no mostró diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos respecto al grupo control. Es decir, la presencia de los probióticos no generó daños en la integridad de la membrana, lo cual es un resultado muy favorable debido a que la pérdida de integridad provocaría daños estructurales y la consiguiente pérdida de su función barrera. Si esto sucediera, facilitaría la entrada y translocación de bacterias (muertas o vivas) y productos

bacterianos (como endotoxinas, exotoxinas y fragmentos de la pared celular) desde la luz del intestino a otros espacios extraintestinales.



La **Figura 48** presenta los resultados del score de inflamación, donde no se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos a los 16 y 44 días. Sin embargo, al día 32, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo tratado con el producto probiótico tricepa 10⁷ UFC/ml, el cual obtuvo el menor valor de score de inflamación (valor 1 = ausencia de inflamación). Esta diferencia no se observó durante el primer ensayo *in vivo*, donde no se observaron diferencias entre el grupo control y dicho tratamiento a los 30 días.

El tercer parámetro histomorfométrico evaluado fue la relación velloso-crypta (**Figura 49**). No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos a lo largo del ciclo de producción.



Resumidamente, el suministro de los productos probióticos en el agua de bebida no tuvo incidencia en la pérdida de integridad de la mucosa intestinal ni en la relación vellosidad-cripta. Sin embargo, el score de inflamación obtenido al día 32 en los animales del grupo tratado con el producto probiótico tricepa 10⁷ UFC/ml fue significativamente menor respecto al control. En general, los animales presentaron buenos puntajes respecto a la pérdida de integridad y el score inflamación, en el rango de 1 a 2, lo que corresponde desde ausencia (en ambos parámetros) hasta engrosamiento de las vellosidades con leve degeneración vacuolar de los enterocitos y edema en la lámina propia con leve infiltrado linfomonocitario, respectivamente.

Aunque no se observaron diferencias significativas en todos los parámetros evaluados, se insinúa una tendencia a obtener mejores resultados con el tratamiento del probiótico tricepa en concentración 10⁷ UFC/ml. Esta tendencia podría comprobarse al realizar el ensayo con un mayor número de animales sacrificados por tratamiento.

3.3.4.2.5 Determinación de los microorganismos en el contenido intestinal

Se trabajó en la puesta a punto de la técnica PCR en tiempo real para determinar las variaciones en la microbiota intestinal de los pollos pertenecientes a los tratamientos evaluados. El objetivo principal fue determinar la concentración de *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus plantarum*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Enterococcus* sp. en la materia fecal de los animales. Los avances alcanzados hasta el momento se presentan en el **Anexo 2**.

3.3.4.2.6 Pesaje de animales

La ganancia de peso es uno de los parámetros productivos más importantes en la producción aviar ya que, como el animal se vende de acuerdo a su peso vivo, este parámetro se encuentra directamente relacionado con la relación costo/beneficio. En este caso, se sumó al pesaje los datos extraídos del galpón. En este segundo ensayo, finalizando el ciclo de crianza, se determinó el peso de los animales teniendo en cuenta la cantidad de machos y hembras por grupo. Como esta proporción fue diferente en cada tratamiento, se esperó que esto afecte los resultados obtenidos respecto a la ganancia de peso ya que los pesos difieren de acuerdo al sexo del animal, especialmente en las últimas semanas de la crianza (Cobb Cares™, 2018).

A modo ilustrativo, se presentan fotos de los animales a lo largo del ciclo de producción (**Figuras 50, 51 y 52**).



Figura 50. Pollos de 16 días de vida pertenecientes al grupo que consume *L. plantarum* CIDCA 83114 en concentración 10^5 UFC/ml.

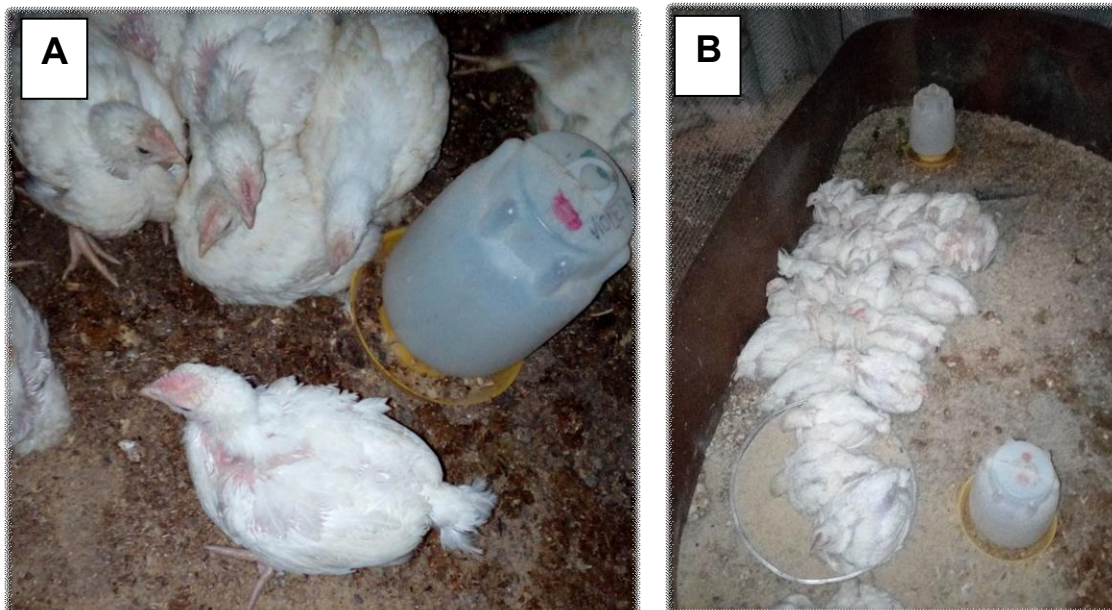


Figura 51. Pollos de 32 días de vida pertenecientes al grupo tratado con el producto probiótico tricepa en concentración 10^8 UFC/ml (A) y grupo control (B).

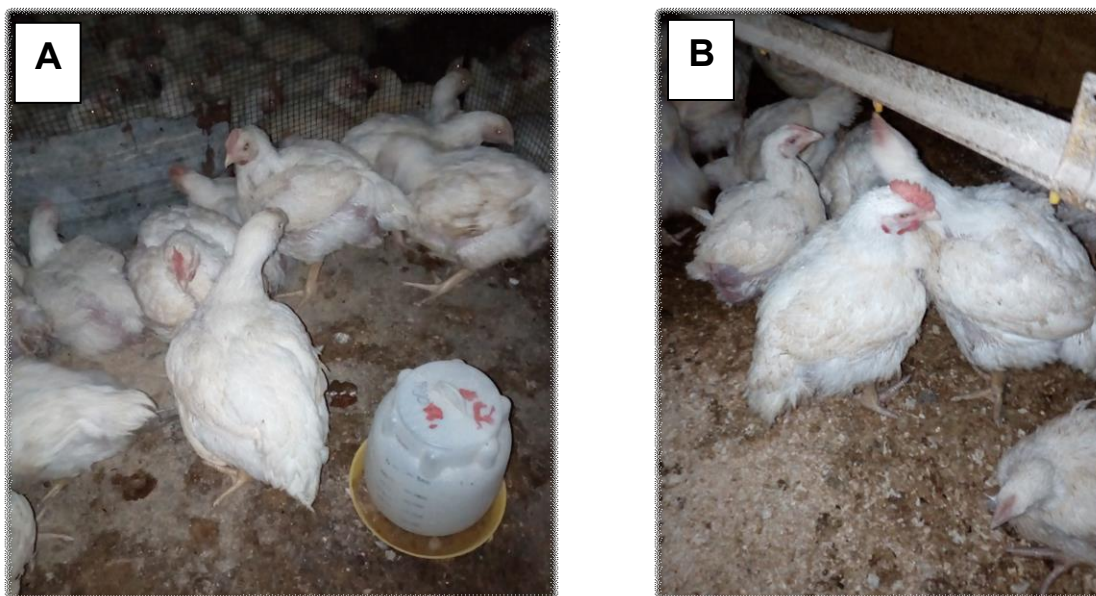
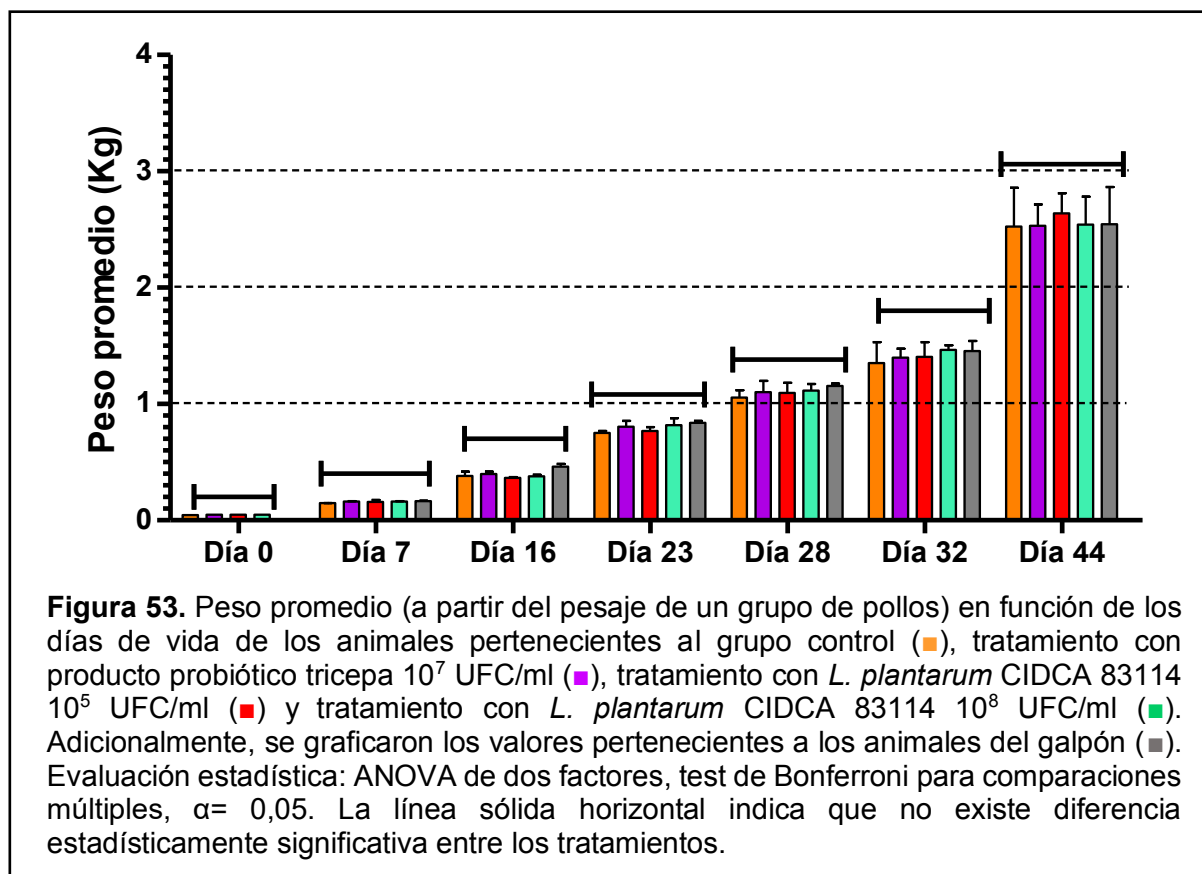


Figura 52. Pollos de 44 días de vida tratados con *L. plantarum* CIDCA 83114 en concentración 10^5 UFC/ml (A) y los pertenecientes al galpón (B).

Los resultados se expresaron como peso promedio a partir del pesaje de un grupo de pollos por día (Figura 53). Los datos para confeccionar la figura se presentan en la Sección 3 del Apéndice 2.



No se encontraron diferencias significativas en el peso promedio de los animales a lo largo del ciclo de crianza entre los tratamientos evaluados y el control. Adicionalmente se recolectaron datos del peso de los pollos alojados en el resto del galpón para realizar la comparación. Es importante resaltar que la disposición de los corrales para este ensayo (Figura 44 y 45) no fue favorable teniendo que cuenta la temperatura ambiente (otoño/invierno) era baja y los mismos estaban armados cerca de la puerta de entrada al galpón; la disposición de los grupos que consumían el producto probiótico tricepa 10⁷ UFC/ml y el grupo que consumía *L. plantarum* CIDCA 83114 10⁸ UFC/ml fue aún más desfavorable debido a que estaban ubicados a los costados del galpón, contra las lonas plásticas que separaban y aislaban térmicamente del exterior. Sin embargo, a pesar de las condiciones ambientales desfavorables que podrían haber causado un estrés térmico en las aves, no se halló una diferencia significativa en los pesos obtenidos por animal al finalizar la producción entre los grupos tratados y el control.

Los resultados de esta Tesis estuvieron en línea con otros autores, donde no se encontraron diferencias en las variables productivas, de acuerdo con el uso de probióticos o diferentes cepas de bacterias ácido lácticas en pollos parrilleros (da Rocha et al., 2010; Hrnčár et al., 2014; Olnood et al., 2015; Salehimanesh et al., 2016).

Al final del ciclo de crianza, se realizó el pesaje de todos los animales en cada grupo, diferenciando entre machos y hembras (Tabla 31 y Figura 54).

Tabla 31. Peso final diferenciando entre hembras y machos pertenecientes al grupo control (■), tratamiento con producto probiótico tricepa 10^7 UFC/ml (■), tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10^5 UFC/ml (■) y tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10^8 UFC/ml (■). Adicionalmente, se graficaron los valores pertenecientes a los animales del galpón (■). Evaluación estadística: ANOVA de dos factores, test de Tukey para comparaciones múltiples, $\alpha = 0,05$. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

SEXO DE LOS ANIMALES	PESO AL FINAL DEL CICLO DE PRODUCCIÓN (Kg)				
	Grupo 10^7 UFC/ml tricepa	Grupo 10^8 UFC/ml Lp 83114	Grupo 10^5 UFC/ml Lp 83114	Grupo Control	GALPÓN
Machos	b, c 2,84	b 2,765 ± 0,200	b, c 2,811 ± 0,150	b, c 2,761 ± 0,383	b 2,868 ± 0,210
Hembras	a, c 2,434 ± 0,076	a 2,315 ± 0,182	a, c 2,524 ± 0,017	a, c 2,366 ± 0,234	a 2,170 ± 0,326

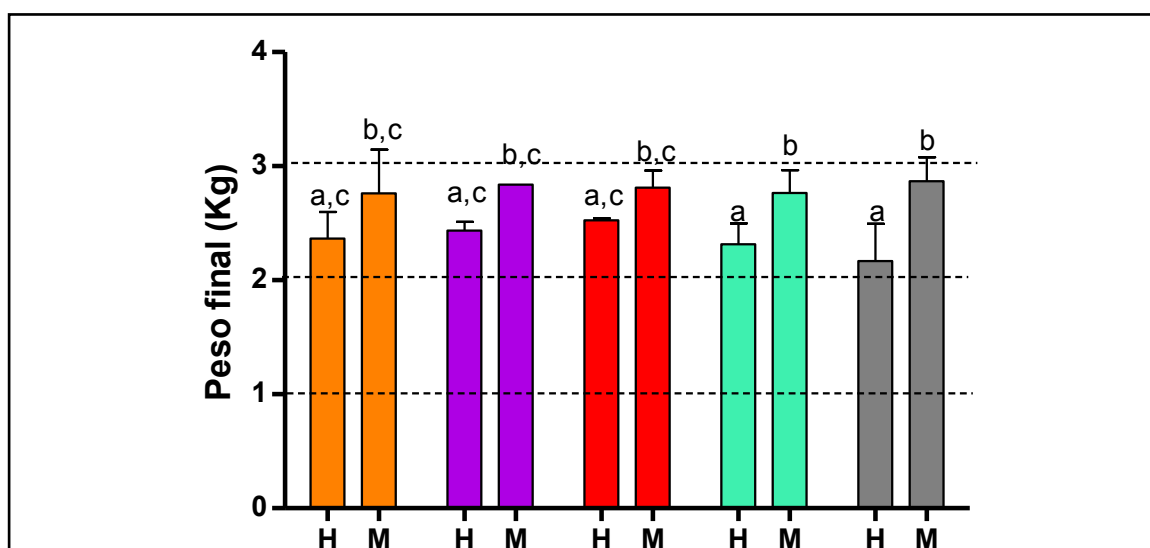


Figura 54. Peso final diferenciando entre hembras (H) y machos (M) de los animales pertenecientes al grupo control (■), tratamiento con producto probiótico tricepa 10^7 UFC/ml (■), tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10^5 UFC/ml (■) y tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10^8 UFC/ml (■) al día 44 de crianza. Adicionalmente, se graficaron los valores pertenecientes a los animales del galpón (■). Evaluación estadística: ANOVA de dos factores, test de Tukey para comparaciones múltiples, $\alpha = 0,05$. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

Al comparar teniendo en cuenta el sexo, las hembras no presentaron diferencias entre los grupos, al igual que en el caso de los machos. Sin embargo, las diferencias observadas entre ambos sexos en cada tratamiento fueron significativas en el caso del tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10^8 UFC/ml y en los animales del galpón.

Estos resultados indican que la diferenciación de los animales respecto al sexo sería indispensable para poder elaborar una conclusión respecto a la ganancia de peso.

De acuerdo a Cobb Cares™ (2018), el peso de una hembra y un macho a los 44 días de vida debería ser 2,757 kg y 3,147 kg, respectivamente. En ninguno de los grupos evaluados en este segundo ensayo *in vivo* se alcanzan estos valores, incluso en los animales del galpón. Esto podría deberse a varias razones, entre las que podemos mencionar las bajas temperaturas especialmente durante las primeras semanas de vida del pollito, el fotoperíodo (ciclos de luz/oscuridad), la calidad del alimento, entre otras (Estrada Pareja 2007; Giobergia, 2018).

Por lo tanto, como conclusión de esta sección, la administración de los probióticos no tuvo influencia en la ganancia de peso respecto al grupo control.

3.3.4.2.7 Pesaje de bolsa de Fabricio y bazo

De la misma manera en que se realizó en el 1° ensayo *in vivo*, se evaluó el peso de la bolsa de Fabricio y del bazo y la relación de estos pesos, lo cual es indicio de una respuesta inmune exacerbada (Figura 55).

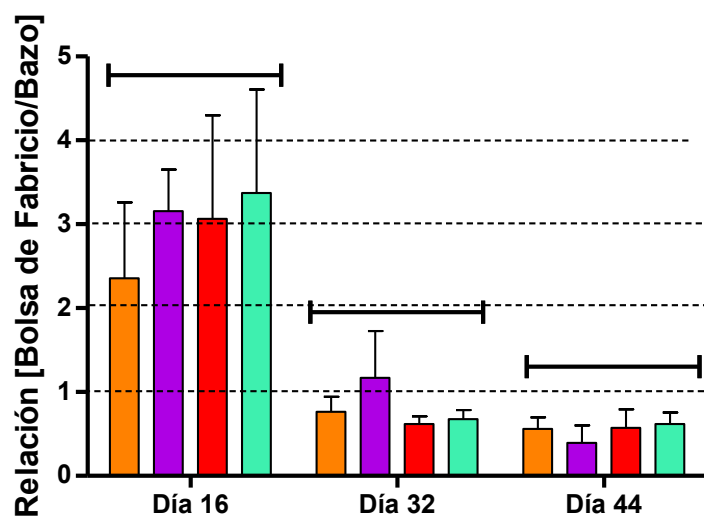


Figura 55. Relación [Bolsa de Fabricio/Bazo] de los pollos en función de los días de vida, de acuerdo al grupo control (■), tratamiento con producto probiótico tricepa 10⁷ UFC/ml (■), tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10⁵ UFC/ml (■) y tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10⁸ UFC/ml (■). Evaluación estadística: ANOVA de dos factores, test de Tukey para comparaciones múltiples, $\alpha = 0,05$. La línea sólida horizontal indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos.

La relación [Bolsa de Fabricio/Bazo] no presentó diferencias significativas entre los grupos evaluados a lo largo del ciclo de crianza.

3.3.4.2.8 Conclusiones del 2° ensayo

En este ensayo la administración del producto probiótico tricepa 10^7 UFC/ml y *L. plantarum* CIDCA 83114, en concentración 10^5 UFC/ml y 10^8 UFC/ml, fue inocua para las aves. Utilizando como referencia los valores del grupo control, se determinó que no generaron daños en la integridad de la membrana, ni estuvieron asociados a procesos de inflamación de la mucosa intestinal; tampoco se encontraron diferencias en el contenido de materia grasa en hígado ni al evaluar la relación [Bolsa de Fabricio-Bazo] al final del ciclo de crianza. En cuanto a la ganancia de peso, los valores de todos los tratamientos, inclusive el grupo control, estuvieron por debajo de los reportados por la empresa productora de esta raza de pollos (Cobb Cares™). Respecto a este último parámetro productivo, hay que tener en cuenta algunas variables que son difíciles de controlar como son la proporción de hembras y machos en cada grupo y la temperatura en la zona de los corrales.

3.4 Conclusiones

En este capítulo se realizó una selección más rigurosa de los aislados con el fin de obtener un producto probiótico multicepa. Para esto, se evaluaron algunas características de crecimiento y tecnológicas que podrían determinar el futuro desarrollo a gran escala y su posible aplicación.

A partir de siete aislados, se seleccionaron *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C y *Enterococcus* sp. 2 como los microorganismos que conforman el producto probiótico tricepa. Estos tres aislados fueron capaces de crecer en todos los medios de cultivo evaluados, inclusive en el medio MRS formulado a partir de sus componentes, de la misma manera que se realiza en la empresa NITRAP SRL., alcanzando concentraciones bacterianas adecuadas en tiempos cortos. Cabe destacar que estos parámetros fueron obtenidos en crecimientos estáticos, es decir, sin agitación. El uso de fermentadores de grandes volúmenes en la empresa podría generar mejores resultados de crecimiento. El escalado de la producción de los aislados es un paso importante que resta evaluar. Se estudiaron diferentes condiciones para conservar, a corto plazo, los microorganismos que forman parte del probiótico y se concluyó que la congelación a -20 °C, utilizando leche como crioprotector, mantuvo viables los microorganismos por varias semanas. Adicionalmente, no perdieron su viabilidad luego de, al menos, dos ciclos de congelación/descongelación.

Estos resultados nos permitieron conservar el producto probiótico sin pérdida de viabilidad durante los experimentos realizados con pollos parrilleros en la granja.

Respecto al 1° ensayo *in vivo*, los pollos que consumieron el probiótico tricepa en concentración 1×10^7 UFC/ml, tuvieron un peso promedio mayor (por animal) al final del ciclo de crianza y aumento de la relación vellosidad-cripta. El aumento de la altura de las vellosidades en el grupo que consumió probiótico es beneficioso para los pollos de engorde ya que el área de superficie aumentada de las vellosidades se asocia al aumento en la eficiencia de crecimiento y en la superficie de absorción de nutrientes.

Respecto al 2° ensayo *in vivo*, tanto los pollos que consumieron el producto probiótico tricepa como los que consumieron *L. plantarum* CIDCA 83114, no demostraron cambios significativos en los parámetros evaluados respecto del control sin probiótico.

Cabe mencionar que es difícil realizar una comparación entre los resultados del 1° y 2° ensayo debido, por un lado, al factor inherente asociado a la variabilidad al trabajar con pollos de engorde; y, por otro lado, debido a factores externos difíciles de controlar como son el traslado de los pollitos BB desde la nacedora hasta el galpón, las diferencias de temperatura detectadas en las distintas zonas del galpón y el cambio de personal encargado del lugar entre uno y otro ensayo, entre otros factores.

Estos dos ensayos *in vivo* fueron un avance preliminar de la acción del producto probiótico tricepa. Para poder obtener resultados robustos, se plantea como perspectiva repetir el ensayo (realizando repeticiones por grupo) y, además, evaluar su eficacia a escala de galpón (con un gran número de animales).

CAPÍTULO 4

Evaluación de la dosis infectiva
mínima de *Salmonella enterica*

4.1. Introducción y Objetivo

Las infecciones con bacterias del género *Salmonella* son responsables de una variedad de enfermedades agudas y crónicas en aves. El animal enfermo, la materia fecal de los roedores, el alimento, el agua, aves de traspatio y/o aves silvestres pueden ser portadores de *Salmonella* y, de esta forma, contaminar el guano y/o la cama (Gast, 2013). Dentro de las serovariedades de este patógeno que causan infecciones, *S. Gallinarum* es la responsable de la tifosis aviar, una grave enfermedad en aves, la cual ha sido erradicada de los criaderos industriales de varios países desarrollados, pero aún subsiste en explotaciones comerciales de Latinoamérica. Las pérdidas económicas causadas por la tifosis aviar pueden ser muy altas, no sólo por la baja de animales debido a la mortalidad, sino también por los costos veterinarios involucrados, eliminación de las aves muertas, saneamiento de las instalaciones infectadas, entre otras (Shivaprasad, 2000).

Cuando esta bacteria ingresa a la granja, se propaga rápidamente a través del polvo, de las heces en camas y por contaminación del agua (Methner et al., 1997). Además, es capaz de sobrevivir durante largos períodos de tiempo en condiciones adversas y puede propagarse de forma horizontal, a través de la ingesta de heces infectadas por pollos sanos y el canibalismo (Hall, 1964; Pomeroy, 1991; Chacana y Terzolo, 2003), como también de forma vertical, a través del huevo.

Por lo general, *S. Gallinarum* es huésped-específica para las especies aviares y no causa enfermedad en el hombre; sin embargo, provoca graves pérdidas económicas a los productores avícolas, razón por la cual se han puesto en práctica extensos programas de control y de erradicación para combatir este patógeno.

Por lo que el objetivo de este capítulo es determinar la mínima concentración de *Salmonella* que provoca daño/enfermedad en pollitos BB.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa *S. enterica* serovar Gallinarum 111 de origen aviar, proveniente de la Estación Experimental Agrícola INTA Concepción del Uruguay. A partir de su stock (conservado a -80°C en glicerol), se realizó un repique en medio de cultivo LB y se incubó a 37 °C durante 18 horas. A partir de este cultivo, se realizó un repique en medio LB fresco para obtener el inóculo de *Salmonella* para el ensayo.

4.2.2 Preparación del inóculo de *Salmonella*

A partir de un cultivo fresco de *Salmonella*, se tomó una alícuota y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet fue suspendido en PBS estéril en igual volumen que el inicial. Luego se realizaron diluciones hasta alcanzar las siguientes concentraciones de trabajo: 10⁵ y 10⁷ UFC/ml.

4.2.3 Animales empleados y condiciones de crianza

Al trabajar con una cepa patógena en alta concentración, tanto el alojamiento de los animales como las necropsias, debieron realizarse en las instalaciones del bioterio perteneciente a la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas-UNLP. El ensayo fue planificado teniendo en cuenta las condiciones pre-establecidas del lugar, ajustando el número de animales y el tiempo de duración del mismo. Se siguió el protocolo experimental N° 003-00-19, el cual fue avalado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (Ver **Anexo 3**).

Se emplearon pollos de 1 día de vida de la línea Cobb, variedad Broiler adquiridos de la empresa Don Mauricio Srl. (Navarro, Buenos Aires).

Los animales recién llegados se dividieron en 3 grupos de 8 animales cada uno. Los animales fueron distribuidos al azar en un diseño completamente aleatorizado, para disminuir la variación inicial. La presencia de machos y hembras en cada grupo fue aleatoria ya que no se realizó el sexado de los animales. Las aves fueron alojadas en cajas plásticas con pisos de viruta, la cual fue previamente esterilizada en autoclave y

secada en estufa. El bioterio fue calefaccionado con estufas de cuarzo, manteniendo la temperatura ambiente en el rango de 29 - 32 °C. Previo a la infección con *Salmonella*, los animales se sometieron a un período de adaptación (estabilización) durante 5 días. El agua y el alimento fueron administrados *ad libitum*. Se utilizó alimento preinicial micropelleteado (Super BB, Biofarma S.A, Argentina) y el agua fue refrigerada con bolsas conservantes previamente sanitizados. El recambio de alimento y agua se realizó dos veces por día. Se controló el comportamiento de los animales por inspección visual, reiteradas veces al día.

4.2.4 Inoculación, sacrificios y toma de muestra

Al día 5 de estadía en el bioterio, los animales fueron infectados con dos concentraciones de *Salmonella* (1×10^7 UFC/ml y 1×10^5 UFC/ml). Cada animal recibió 0,5 ml de inóculo a través de una sonda intragástrica y en una sola dosis (concentración de *Salmonella* 5×10^6 UFC/pollo y 5×10^4 UFC/pollo). Los animales del grupo control fueron inoculados con un mismo volumen de PBS estéril.

Los sacrificios se realizaron a las 6, 24 y 48 horas y 6 días post-infección, mediante dislocación cervical. En cada sacrificio se analizaron dos animales por grupo y se realizaron las siguientes determinaciones:

4.2.5 Observación de lesiones sistémicas características de infección por *Salmonella*

Se realizaron necropsias en las cuales se analizó visualmente la apariencia de todos los órganos internos (hígado, bazo, corazón, intestino, ciegos, riñones, pulmones) y articulaciones en general, en búsqueda de lesiones compatibles con la infección por *Salmonella*. Durante el período experimental, también se observaron diariamente la mortalidad y signos clínicos en las aves, como decaimiento, plumas rizadas, ojos entrecerrados.

4.2.6 Análisis histopatológico de intestino e hígado

Se tomaron muestras de bazo e hígado para realizar el análisis histológico, el cual fue realizado por personal del Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades de las Aves y

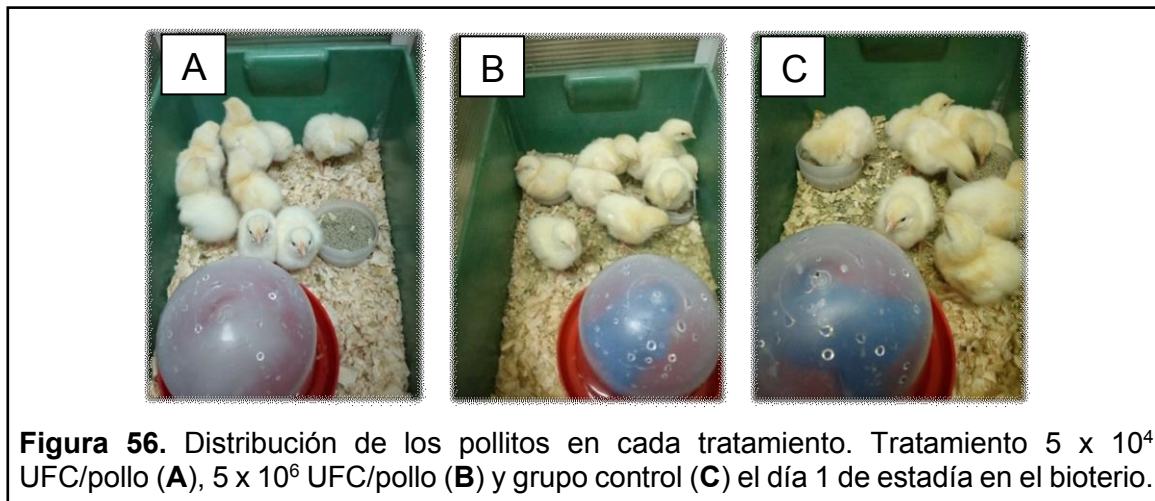
los Pilíferos de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). El protocolo utilizado para el análisis fue el siguiente: las muestras se fijaron en formol neutro al 10 % v/v (pH 7,2) durante 48 horas. Luego se las incluyó, de manera rutinaria, en un procesador automático de tejidos (Leica TP1020 Automatic Tissue Processor, Leica Microsystems, Nussloch, Alemania) llevando a cabo una deshidratación progresiva, dada por un determinado número de pasajes por diferentes soluciones de alcohol etílico: alcohol 50° (1 pasaje), alcohol 80° (1 pasaje), alcohol 96° (3 pasajes) y alcohol 100° (3 pasajes). Se realizó el aclaramiento de las muestras en xileno (Xileno puro, Biopack) (2 veces) y su infiltración e inclusión en parafina (Parafina PF 56 - 58 °C [Pellets], Biopack). Finalmente, se realizó el corte de los mismos con un micrótopo (Leica RM2235 Rotary Microtome, Leica Microsystems) a un espesor de 4 µm y finalmente, tinción con hematoxilina y eosina (Hematoxilina cristal, Biopack; Eosina amarillenta, Biopack). La hematoxilina es un colorante básico que se une a núcleos y ADN, mientras que la eosina es un colorante ácido que se une al citoplasma. De esta forma, los núcleos se teñirán de color azul, y el citoplasma y la matriz extracelular se teñirán de tonalidades variables de rosas (Martoja y Martoja-Pierson, 1970; Fischer et al., 2008).

4.3 Resultados y Discusión

Todos aquellos factores que puedan influir de manera negativa en la morfo-fisiología del pollito tendrán un impacto en los índices de mortalidad y producción (Yerpes et al., 2018). De hecho, en la cadena de producción aviar, la producción de pollitos de un día de vida de alta calidad es la clave que determina la eficiencia económica de la misma (Yassin et al., 2009).

El ensayo se realizó con la cepa *S. Gallinarum* 111. El fundamento de esta elección se basó en que esta serovariedad es una de las más importantes a nivel productivo ya que su presencia es la causante de salmonelosis o tifosis aviar, provocando grandes pérdidas económicas.

En la **Figura 56** se muestra la distribución de los grupos.



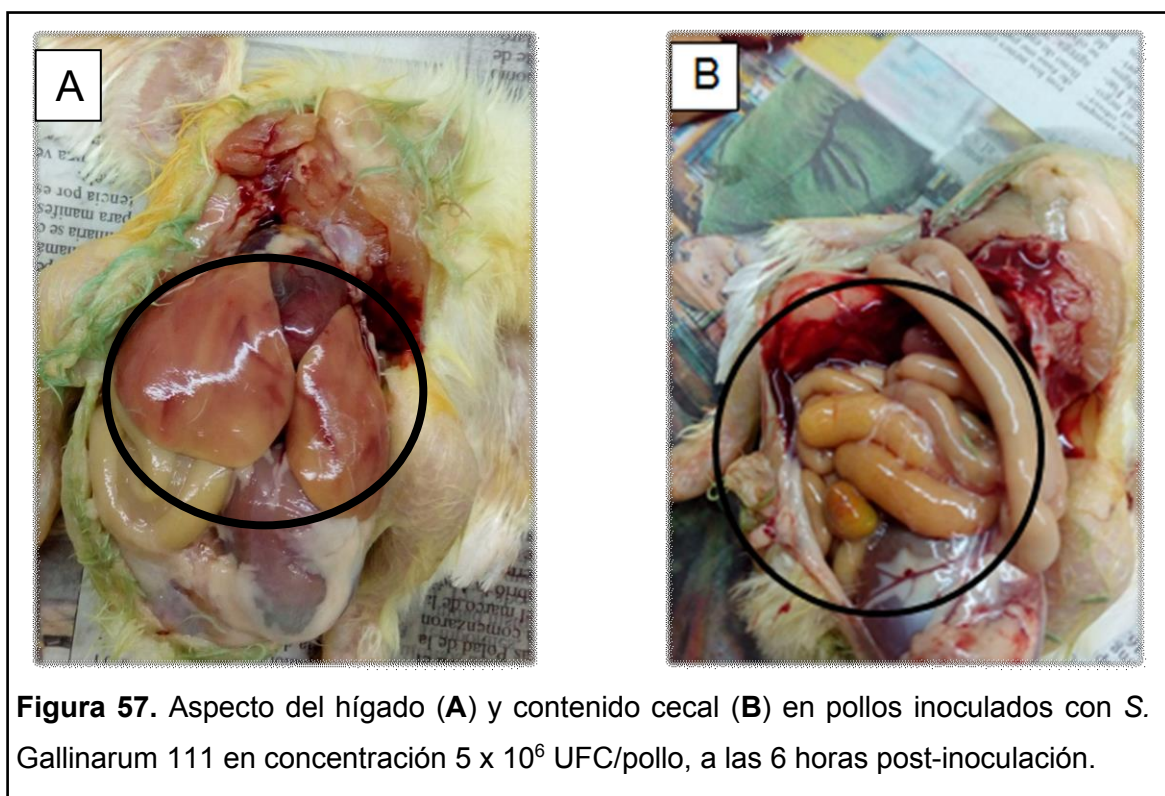
4.3.1 Observación de lesiones sistémicas características de infección por *Salmonella Gallinarum*

Las lesiones, tanto micro como macroscópicas, en la infección con esta serovariedad dependen del curso de la enfermedad: en casos hiperagudos, el ave muere sin lesiones macroscópicas (Herrera, 2018). Aunque la enfermedad es de carácter septicémico en los estadios avanzados, los órganos más afectados son el hígado, bazo y corazón; y los signos clínicos que se observa con más frecuencia son cansancio, falta de reacción y apetito (Chacana & Terzolo, 2003).

De acuerdo a Pulido-Landínez (2017), las lesiones observadas en las necropsias se alejan de las reportadas en la literatura. Si bien es cierto que aún se puede observar el típico hígado bronceado-verdoso; en la mayoría de los casos se encuentra el hígado friable, aumentado de tamaño, con múltiples focos necróticos (pequeñas manchas blancas) y/o hemorrágicos y algunas zonas verdosas. Los pulmones también pueden presentar pequeños focos blancos. El bazo muestra esplenomegalia (agrandamiento) con aspecto moteado. Es posible observar en algunos casos nefromegalia (agrandamiento) y coloración verdosa de los riñones, aerosaculitis (infección de los sacos aéreos, presencia de exudado blanquecino) de leve a moderada, ooforitis (inflamación de las trompas de Falopio) con folículos ováricos deformes, algunas veces verdosos y/o hemorrágicos, duros al tacto y, con menos frecuencia, anomalía pulmonar. En pollos de engorde la lesión más frecuentemente observada ha sido esplenomegalia con bazos muy oscuros, leve aerosaculitis y presencia de focos necróticos en el hígado.

A fin de facilitar la comparación visual del tamaño y estado general de los órganos internos, se realizaron necropsias en paralelo con animales de los tres grupos.

A las **6 horas post-inoculación** se observó que las aves inoculadas con ambas concentraciones del patógeno (tratamiento 5×10^4 UFC/pollo y tratamiento 5×10^6 UFC/pollo) presentaron hígados en tonos marmolados (**Figura 57, A**) y uno de los animales del grupo inoculado con 5×10^6 UFC/pollo presentó pericarditis. El contenido cecal de los dos animales del grupo inoculado con 5×10^6 UFC/pollo fue de color amarillo claro y con presencia de gas (**Figura 57, B**). En los órganos internos de los pollos del grupo control no se observaron lesiones compatibles con la presencia de *Salmonella*.



A las **24 horas post-inoculación** los animales infectados con ambas concentraciones del patógeno presentaron contenido cecal de color amarillo claro y con presencia de gas (**Figura 58, A**). Adicionalmente, dos aves sacrificadas del grupo 5×10^6 UFC/pollo presentaron nefromegalia. Uno de los pollos inoculados con 5×10^6 UFC/pollo y otro del grupo inoculado con 5×10^4 UFC/pollo, presentaron hígados de consistencia friable (de fácil disgregación) (**Figura 58, B**). Respecto al grupo control, los animales no presentaron alteraciones.

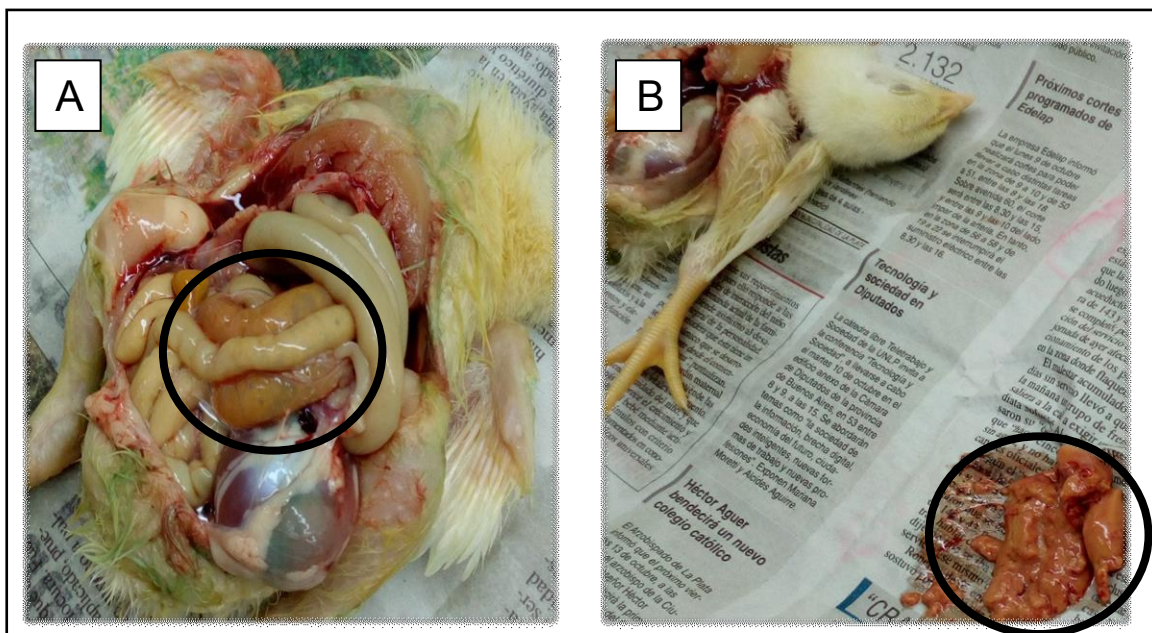


Figura 58. Aspecto del contenido cecal en pollos inoculados con *S. Gallinarum* 111 en concentración 5×10^4 UFC/pollo (A) y aspecto del hígado (B) en pollos inoculados con *S. Gallinarum* 111 en concentración con 5×10^6 UFC/pollo, a las 24 horas post-inoculación.

A las **48 horas post-inoculación**, los pollitos del grupo control no mostraron alteraciones, mientras que todos los animales infectados con el patógeno, en ambas concentraciones, presentaron contenido cecal de color amarillo y presencia de gas. Esta condición fue, visualmente más notoria, en los pollos inoculados con la mayor concentración de *Salmonella* (Figura 59, A).

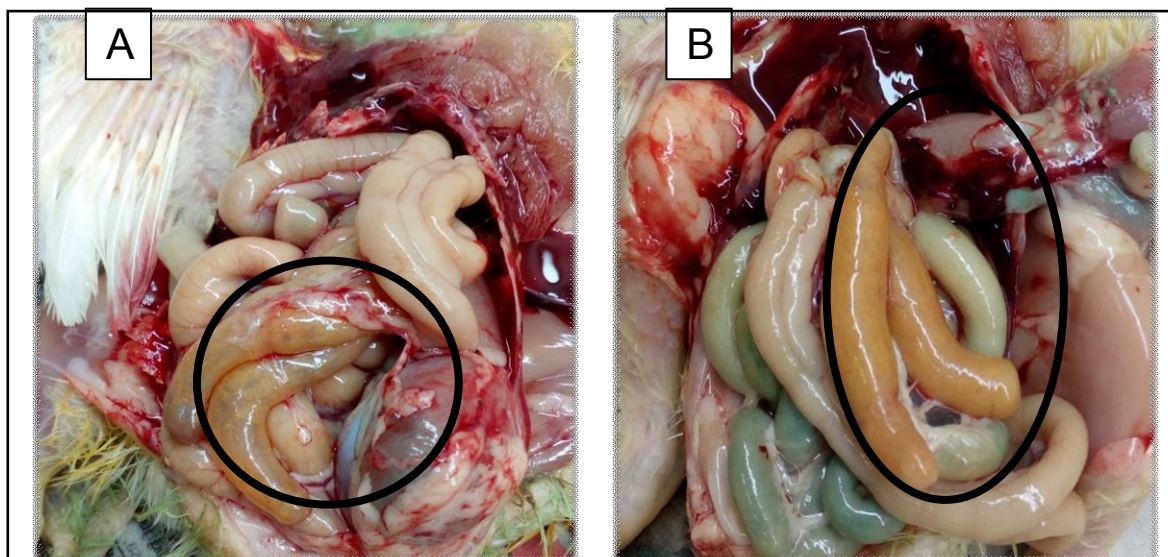


Figura 59. Aspecto del contenido cecal en pollos inoculados con *S. Gallinarum* 111 en concentración 5×10^6 UFC/pollo (A) e inoculados con *S. Gallinarum* 111 en concentración 5×10^4 UFC/pollo (B) a las 48 horas post-inoculación.

A los **6 días post-inoculación** los pollos del grupo control no presentaron lesiones en sus órganos internos. Uno de los animales inoculados con 5×10^6 UFC/pollo fue encontrado muerto y el otro estaba severamente deprimido. Éste fue sacrificado y se pudo observar el agrandamiento de órganos internos (bazo, hígado, corazón, riñones), además de tener el saco vitelino hemorrágico, lo cual es un indicio de infección. En la **Figura 60** se muestra el aspecto de los órganos de un pollo del grupo control (sin inocular) y de un pollo inoculado con *S. Gallinarum* 111 en concentración 5×10^6 UFC/pollo.

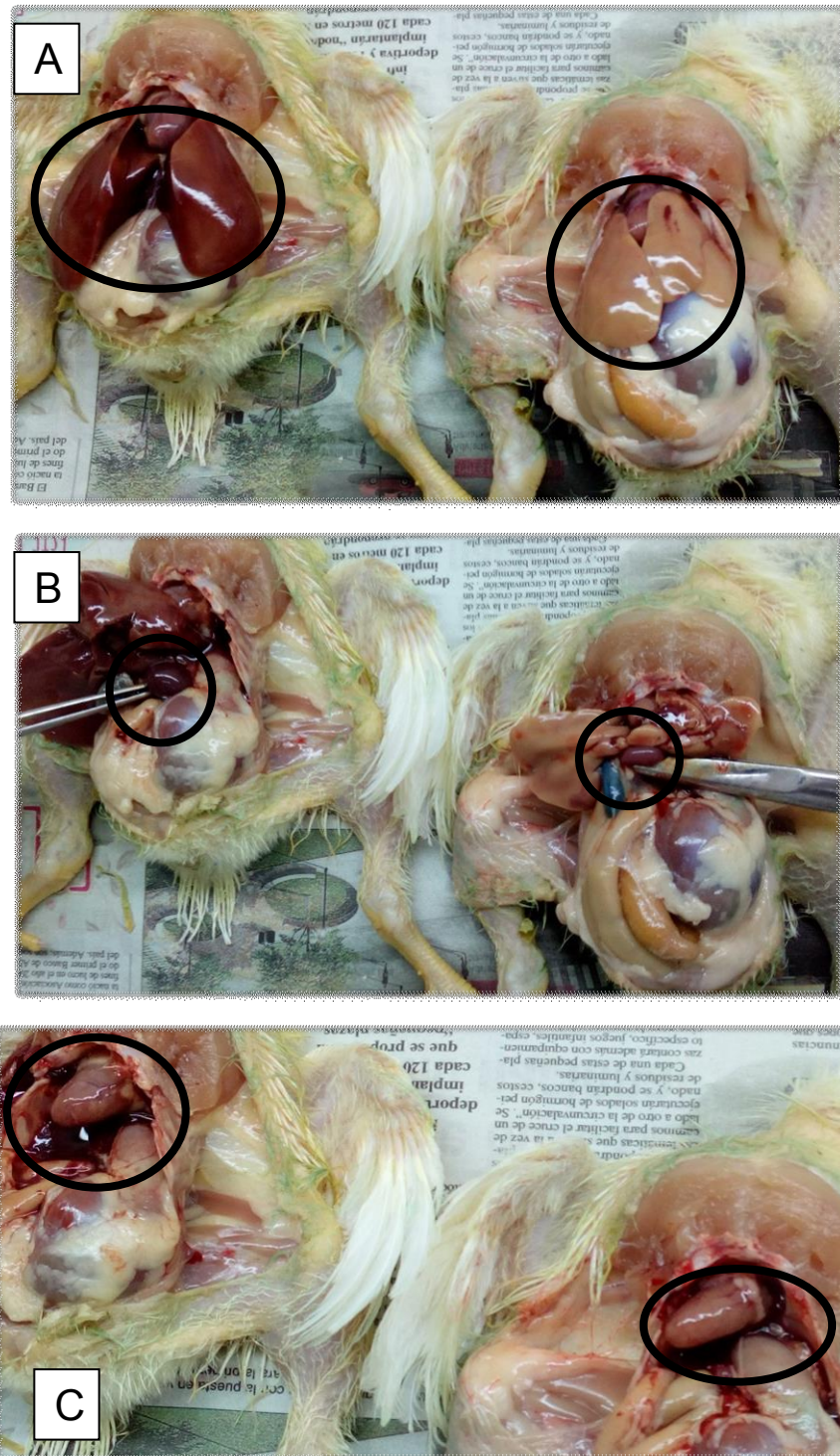


Figura 60. Aspecto de los órganos en pollos inoculados con *S. Gallinarum* 111 en concentración 5×10^6 UFC/ml (**pollo izquierdo**) y sin inocular (**pollo derecho**). Comparación del tamaño de hígado (A), bazo (B) y corazón (C), a los 6 días post-inoculación.

Al comparar un pollo del grupo infectado con la menor concentración de *S. Gallinarum* 111 (5×10^4 UFC/pollo) y un pollo sin inocular, se observó agrandamiento del bazo (Figura 61) y de los riñones (nefromegalia).

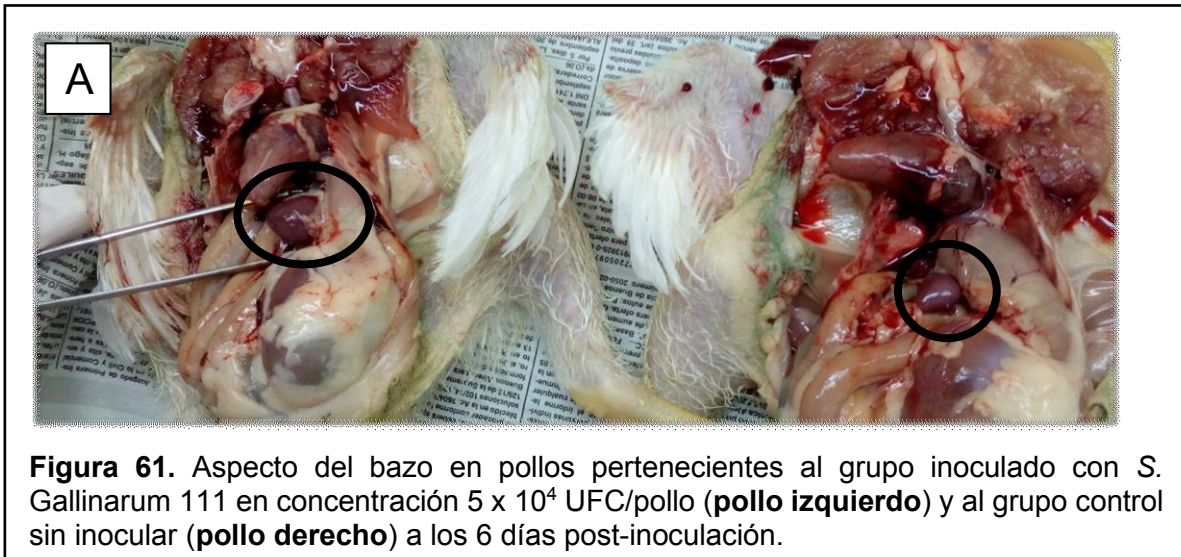


Figura 61. Aspecto del bazo en pollos pertenecientes al grupo inoculado con *S. Gallinarum* 111 en concentración 5×10^4 UFC/pollo (**pollo izquierdo**) y al grupo control sin inocular (**pollo derecho**) a los 6 días post-inoculación.

Si bien se ha analizado los órganos de las aves infectadas, es importante señalar que la infección con *S. Gallinarum* puede causar inflamación en las articulaciones, con presencia de un fluido líquido cremoso (The Center of Food Security & Public Health, 2009). Durante todo el ensayo, no se encontraron signos de inflamación ni de líquido en las articulaciones de los pollos, tanto en el grupo control como en los grupos de animales infectados.

De acuerdo con la información recopilada a lo largo de las necropsias, se observó que la infección con *S. Gallinarum* 111, en concentración 5×10^4 UFC/pollo y 5×10^6 UFC/pollo, afectó la salud de los animales. Dicho efecto se evidenció en la presencia de contenido gaseoso en intestino y ciegos, y agrandamiento de órganos internos, como bazo, hígado, corazón y riñón. También se observaron cambios en el comportamiento de los animales, con signos de decaimiento: mientras que los pollos del grupo control se comportaban normalmente, reaccionando a los estímulos externos, los infectados con *Salmonella* 5×10^4 UFC/pollo reaccionaban moviéndose lentamente y los animales infectados con *Salmonella* 5×10^6 UFC/pollo no se movían y se los notaba decaídos al final del ensayo. Estos cambios clínicos pueden asociarse a la presencia de *S. Gallinarum* en los pollos (Alvarez et al., 2003; Freitas Neto et al., 2007; Garcia et al., 2010).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lopes et al. (2016), donde los pollos infectados con 10^6 UFC de *S. Gallinarum* mostraron signos clínicos de infección a los 4 días post-inoculación, como diarrea de color amarillo verdoso, anorexia, postración, plumas rizadas y disminución del consumo de alimento y agua. Rocha e Silva et al. (2015) inocularon diferentes concentraciones de *S. Gallinarum* (en el rango de 5×10^4 UFC/pollo a $2,5 \times 10^6$ UFC/pollo) en codornices y hallaron signos clínicos típicos de

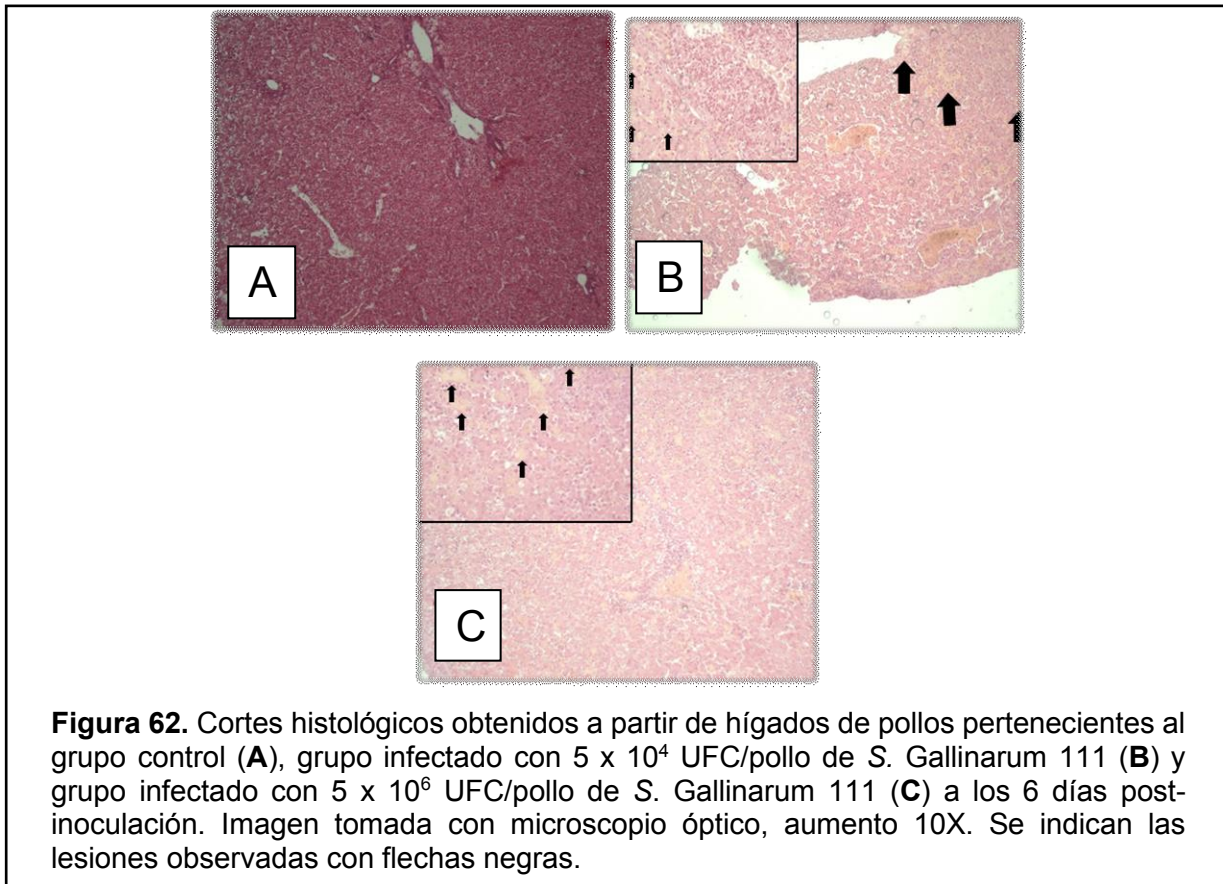
fiebre tifoidea y agrandamiento de órganos (hepatomegalia, esplenomegalia, vesícula biliar dilatada; hemorragias en el hígado e intestinos y folículos ováricos deformados) a los 5 días post-infección, momento en el cual empezaron a morir los animales hasta el día 10 post-infección, inclusive. En esta Tesis, uno de los animales murió al día 6 post-infección y el otro animal del mismo grupo se encontraba muy decaído, además de observarse los agrandamientos de los órganos, coincidiendo con lo encontrado por Rocha e Silva et al. (2015).

Por lo tanto, la inoculación de *S. Gallinarum* en concentración 5×10^4 UFC/pollo podría ser la dosis indicada que cause daños en el animal, sin llegar a provocarle la muerte.

4.3.2 Análisis histopatológico de intestino e hígado

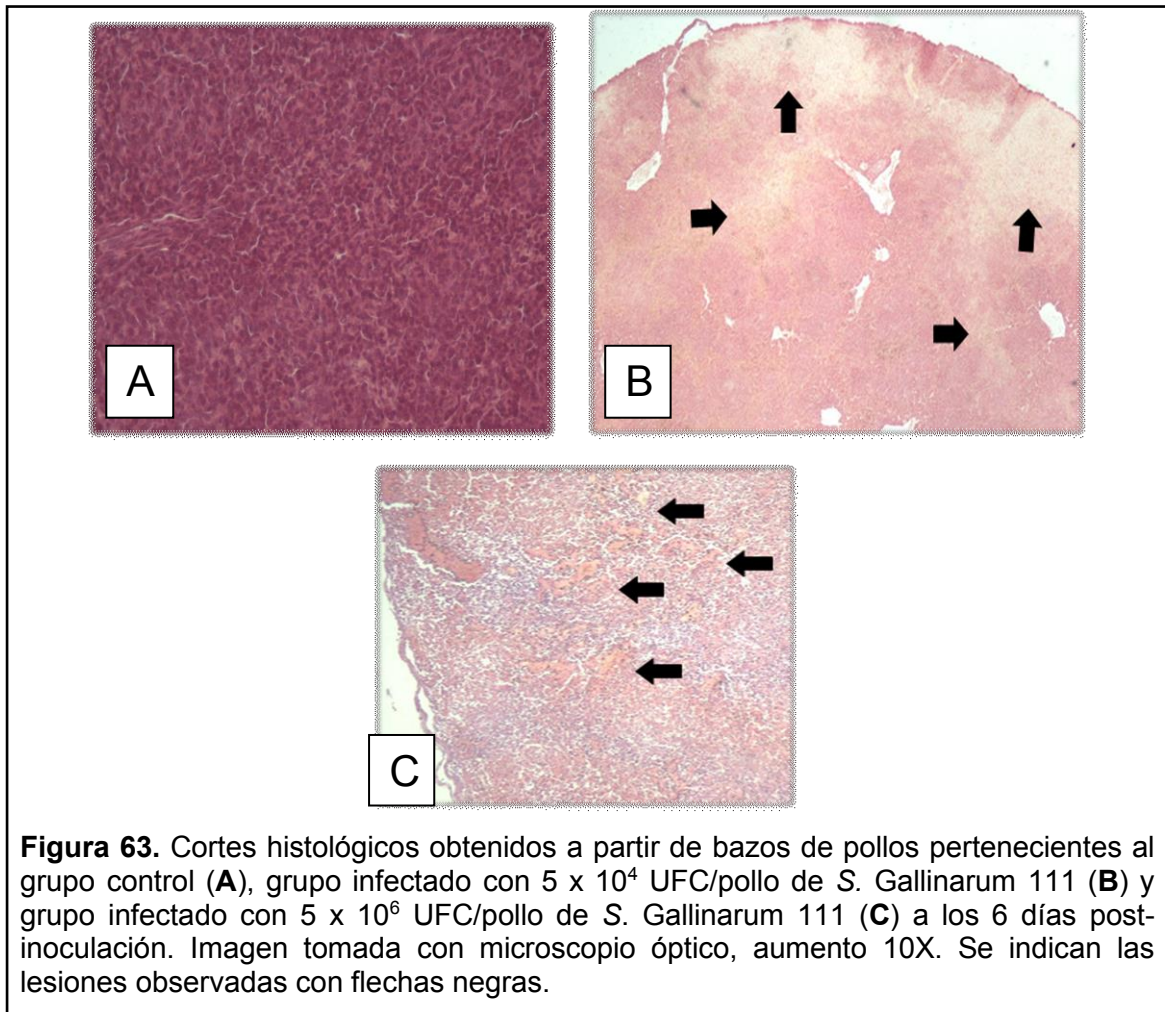
Durante el proceso infectivo de *S. Gallinarum*, los órganos más afectados son el hígado, corazón y bazo. Dependiendo de la gravedad de la enfermedad, pueden encontrarse distintos tipos de lesiones. En cuadros agudos, se observa la congestión especialmente de bazo e hígado, siendo típica en este último, la necrosis de hepatocitos. En estos casos, se observa infiltración de células inflamatorias provenientes de diferentes poblaciones: heterófilos, macrófagos y linfocitos y células plasmáticas (Berchieri et al., 2000; Hossain & Islam, 2004).

En cuadros crónicos, los órganos más afectados son el corazón, hígado, bazo, riñones y órganos reproductivos. La histopatología se caracteriza por congestión vascular severa en hígado, bazo y riñones. Se puede ver necrosis multifocal de hepatocitos con infiltrado de heterófilos y fibrina en parénquima. En general, se observa congestión en los órganos afectados, y las lesiones nodulares corresponden a necrosis con infiltrado heterofílico y fibrina. En corazón, se observa necrosis con infiltrado de heterófilos, linfocitos y plasmocitos. En ovario y testículos, las lesiones se corresponden con inflamación fibrinosupurativa a piogranulomatosa (Shivaprasad, 2000; Swayne, 2013). Se realizó el análisis histopatológico de los hígados y bazos extraídos durante la necropsia a los 6 días post-inoculación. Se observaron lesiones en los animales pertenecientes a los dos grupos infectados con *S. Gallinarum* 111, mientras que los órganos del grupo control no evidenciaron lesiones. Los cortes histológicos obtenidos de los hígados (**Figura 62**) y bazos (**Figura 63**) se presentan a continuación.



Al observar el tejido hepático del grupo control, se encontró que estaba sin presencia de alteraciones, edemas o infiltrados celulares. Respecto al hígado de un pollo inoculado con *Salmonella* Gallinarum 111 en concentración 5×10^4 UFC/pollo, se observó la presencia de múltiples focos aleatorios, coalescentes, de necrosis coagulativa hepatocelular (flechas negras en la **Figura 62 (B)**). En la **Figura 62 (C)**, correspondiente al hígado del pollo inoculado con la mayor concentración (5×10^6 UFC/pollo), se observaron múltiples focos difusos de necrosis coagulativa hepatocelular (flechas negras).

Respecto al análisis histopatológico de las muestras de bazo, los cortes histológicos obtenidos se observan en la **Figura 63**.



El tejido del bazo del grupo control no presentó alteraciones, edemas o infiltrados celulares (**Figura 63, A**). En los bazos de los animales inoculados con *Salmonella Gallinarum* 111 se presentaron lesiones. En el bazo de un pollo inoculado con *Salmonella Gallinarum* 111 en concentración 5×10^4 UFC/pollo, se observó necrosis multifocal coalescente severa con depleción linfoide esplénica severa (**Figura 63, B**, indicado con flechas negras). El bazo del pollo inoculado con la mayor concentración (5×10^6 UFC/pollo), presentó múltiples focos coalescentes de necrosis coagulativa esplénica (**Figura 63, C**).

Estos resultados coinciden con los encontrados en otros trabajos. Kwon et al. (2008) infectaron pollos de 10 días de vida con *S. Gallinarum* (10^5 UFC/ pollo) y a los 6 días post-infección realizaron los estudios histopatológicos encontrando congestión y necrosis en riñón e hígado. Da Silva et al. (2016) encontró que la mitad de los pollos del ensayo, infectados naturalmente con el patógeno, presentaron algún tipo de lesión en hígado, mientras que los animales no infectados no presentaron lesiones. Con iguales resultados, Lopes et al. (2016) halló que el hígado y bazo de pollos inoculados con $1 \times$

10⁶ UFC del patógeno presentaron lesiones como hepatitis necrotizante multifocal y esplenitis necrotizante.

A partir de los análisis histopatológicos realizados en esta Tesis, se pudo concluir que la presencia del patógeno en los pollos infectados provocó lesiones en bazo e hígado, los cuales son los principales órganos que se ven comprometidos durante la infección con *S. Gallinarum*.

4.4. Conclusiones

De acuerdo a las necropsias y al análisis histopatológico de bazo e hígado, se comprobó que la cepa *S. Gallinarum* 111 pudo generar patología en los pollitos de 1 día de vida, con aparición de los primeros cambios en la morfología de los órganos a las 6 horas post-inoculación. Se determinó que la concentración del patógeno de 5×10^4 UFC/pollo, fue la dosis infectiva mínima con capacidad de generar daños en los pollitos BB pero sin llegar a provocarles la muerte.

La información obtenida en el ensayo preliminar presentado en este capítulo será sumamente necesaria para una etapa posterior, en la cual el objetivo final será evaluar *in vivo* el efecto del producto probiótico tricepa frente a la infección con esta cepa de *Salmonella* en los pollos.

Queda como perspectiva de este estudio la aplicación del producto tricepa en desafíos contra patógenos como *Salmonella*. Para ello, tomamos como antecedentes los resultados obtenidos por numerosos trabajos que emplean bacterias lácticas y/o probióticos (Adhikari & Kim, 2017).

**DISCUSIÓN GENERAL
Y
PERSPECTIVAS**

Discusión General y Perspectivas

A lo largo de los años la industria avícola en Argentina ha evolucionado y crecido marcadamente, lo cual ha traído nuevos desafíos en pos de sostener el ritmo de producción intensivo. El uso indiscriminado de antibióticos utilizados como promotores de crecimiento (APC) para sostener la producción ha favorecido la diseminación de resistencias bacterianas, lo cual conlleva a buscar alternativas a los APC. Una de ellas son los probióticos.

El trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral formó parte de un Proyecto de Investigación y Desarrollo (PID 2014-0049) denominado “Producción de probióticos aviares para la República Argentina”. En este punto, se debe destacar la importancia del nexo creado entre la industria/sector privado y la universidad pública con el objeto de llevar a cabo el desarrollo conjunto de un nuevo producto probiótico desde cero.

El objetivo principal de esta tesis fue aislar diferentes bacterias del tracto gastrointestinal de una de las razas de pollos de mayor comercialización en el país (Cobb) para formular un producto probiótico de origen nacional. El concepto asociado a que el probiótico esté conformado por más de una cepa radicó en el hecho de obtener una herramienta que pueda ser útil para resolver diferentes problemas que se presentan a lo largo de la cadena de producción aviar. Idealmente, cada microorganismo integrante del probiótico tendrá un mecanismo de acción único y diferente al resto, ampliando así el campo de acción del producto completo.

En la primera parte de esta Tesis Doctoral, se aislaron un total de 59 bacterias lácticas de buche, yeyuno - íleon y ciegos, a partir de las cuales se estudiaron algunas características probióticas *in vitro*, como resistencia a la acidez, resistencia a la bilis y resistencia al pasaje por el tracto gastrointestinal. Los resultados de estos estudios podrían predecir la capacidad *in vivo* de las cepas; de ahí que el éxito de un probiótico depende en gran medida de realizar una buena selección *in vitro*. Durante el desarrollo de esta Tesis, no se perdió de vista la futura aplicación del producto probiótico, para lo cual sería necesario obtener, a escala industrial, una alta concentración de los aislados en el menor tiempo. Por ello, se evaluaron medios de cultivo alternativos al MRS comercial, ya que su uso es posible a escala laboratorio, pero deja de serlo a gran escala, por su alto costo. Los aislados demostraron ser capaces de crecer en permeado de suero y permeado de suero adicionado con extracto de levadura, en concentraciones comparables a las obtenidas utilizando MRS. Este medio constituye una alternativa económica para el cultivo a nivel industrial de los aislados. Finalmente, en base a estas características, se seleccionaron 13 de los aislados (diez *Lactobacillus* sp. y tres *Enterococcus* sp.)

Otra característica probiótica evaluada para continuar con la selección de los aislados fue la capacidad de ejercer acción antagónica frente a microorganismos patógenos. En este estudio, el enfoque se centró en *Salmonella enterica*, debido a que este patógeno se encuentra ampliamente distribuido a lo largo de la cadena avícola. Esta bacteria puede afectar a las aves, como es el caso de la serovariedad Gallinarum, agente causante de la tifosis aviar; o puede causar una ETA (Enfermedad Transmitida por los Alimentos) al entrar en contacto con los humanos, en el caso de la serovariedad Enteritidis. También se incluyó en los estudios de inhibición una cepa multirresistente de *Escherichia coli* aislada de pollos enfermos de una granja local, cuyos resultados resultaron de sumo interés.

A través de diferentes ensayos, se evaluó el efecto de los aislados en el crecimiento y en la acción patógena de *Salmonella* y *E. coli*, y se pudo comprobar el fuerte efecto inhibitorio de los metabolitos presentes en el sobrenadante libre de células (SLC) obtenido a partir de los medios de cultivo de los microorganismos probióticos, el cual se conserva aún al ser diluido. Este dato no debe pasar desapercibido si tenemos en cuenta que, aunque el objetivo principal de este trabajo fue la obtención de microorganismos probióticos para administrárselos a los pollos, los SLC tienen la potencialidad de ser empleados en el control ambiental de la granja mediante el rociado y desinfección de las camas. El hecho de poder diluir el SLC generaría un mayor rendimiento a partir del cultivo del microorganismo probiótico, sin comprometer la acción inhibitoria. Debe tenerse en cuenta que las diluciones a emplear del SLC son determinadas por el patógeno que se quiera eliminar. La composición de los sobrenadantes mediante HPLC arrojó como resultado que todos los aislados producían ácidos orgánicos débiles (ácido láctico y ácido acético), tanto en caldo MRS, como en el medio constituido por permeado de suero suplementado con extracto de levadura.

Los estudios de la fracción microbiana del cultivo de los microorganismos probióticos en la inhibición de *Salmonella*, permitieron determinar que sólo algunos de éstos inhibieron su crecimiento en coinubación a tiempos cortos (máximo, 4 horas). Por otro lado, ningún aislado fue capaz de inhibir el proceso de formación de biofilm (en coinubación) ni de disminuir significativamente los fenómenos de asociación e invasión de este patógeno a la línea celular Caco-2/TC-7 *in vitro*.

Al finalizar esta segunda parte en la que se evaluó el carácter inhibitorio de los aislados, se evidenció la gran potencialidad de los SLC provenientes de los cultivos de los aislados, como inhibidores de *Salmonella* y *E. coli*. La acción inhibitoria de la fracción microbiana no se halló en todos los casos.

La siguiente etapa consistió en formular el producto probiótico y evaluar su efecto durante la crianza de los pollos. Para ello, se realizó una selección más exhaustiva de

los aislados con las mejores características probióticas evaluadas hasta esta parte. Además del efecto inhibitorio frente a *Salmonella* y *E. coli*, se tuvieron en cuenta la acción antifúngica y la termotolerancia (de los *Enterococcus* sp), estudios que fueron realizados por las becarias doctorales Lic. Carolina Valiente e Ing. Luján Cejas, respectivamente, quienes también hicieron parte del proyecto PID. Las investigaciones llevadas a cabo, en forma paralela y junto a esta Tesis, contribuyeron al avance del proyecto.

Para realizar la selección final de los aislados, se evaluó su crecimiento en un medio de cultivo sugerido por la empresa: el MRS formulado a partir de sus componentes. De acuerdo a todos los resultados reunidos hasta el momento, se seleccionaron *L. salivarius* 1234C, *L. agilis* 1235C y *Enterococcus* sp. 2 para constituir el producto probiótico tricepa. Se realizaron dos ensayos para evaluar el efecto del producto probiótico en los pollos. La administración del probiótico tricepa y la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114 no produjo efectos adversos sobre el estado de salud general de los animales. Adicionalmente, la ausencia de translocación a los órganos del medio interno, sugieren que las cepas utilizadas no son patogénicas y son seguras para ser aplicadas como aditivo alimentario en la dieta de pollos parrilleros.

La razón por la cual se obtuvieron diferentes resultados entre los dos ensayos es difícil de hipotetizar ya que se debería tener en cuenta, principalmente, el factor inherente asociado a la variabilidad al trabajar con pollos de engorde. Por otro lado, existen factores externos difíciles de controlar, como el traslado de los pollitos BB desde la planta de nacedoras hasta el galpón, las diferencias de temperatura detectadas en las distintas zonas del galpón y el cambio de personal encargado del lugar entre uno y otro ensayo. Estos factores condujeron a que los resultados obtenidos en cada ensayo no fueran comparables entre sí. Sin embargo, se pudo notar que un mismo producto probiótico no generó efecto significativos en los parámetros productivos, lo que nos indicaría que su acción probiótica dependerá de diversos factores y su aplicación quedará supeditada a ellos.

Los probióticos estudiados en esta Tesis podrían ser incorporados en la dieta de pollos parrilleros como un aditivo para mejorar las condiciones sanitarias de la producción intensiva. Sumado a esto, los metabolitos producidos por las bacterias probióticas se podrían aplicar junto con otras maniobras de prevención y conservación de los productos derivados y de contaminaciones ambientales.

A partir de este trabajo de Tesis Doctoral, se abre un abanico interesante de perspectivas para continuar con el trabajo, las cuales se mencionan a continuación:

- Estudio de la aplicación del probiótico tricepa a escala de galpón (con mayor número de animales).
- Evaluación del efecto alcanzado en control ambiental y productos derivados, (por ej., control fúngico de camas, huevos) por aplicación del SLC.
- Escalado de la producción de los aislados.
- Estudio de metabolitos en los SLC (bacteriocinas, enterocinas, peróxido de hidrógeno)
- Conservación de las cepas, tema que se desarrollará en el trabajo post doctoral.

APÉNDICES

Apéndice 1**1. Buffers y medios de cultivo**

Todos los medios de cultivo, excepto los casos indicados, se esterilizaron en autoclave a 120° C, durante 15 minutos.

a) Caldo MRS (De Man, Rogosa, Sharpe, 1960), Biokar Diagnostics, Beauvais, France. (en 1 litro de agua destilada)

Componente	Cantidad (g)
Peptona universal	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
D(+) glucosa	20
K ₂ HPO ₄	2
Tween 80	1
Citrato ácido de amonio	2
Acetato de sodio	5
MgSO ₄	0,1
MnSO ₄	0,05
pH = 6,5±0,1	

b) Agar MRS

Caldo MRS adicionado con agar (Parafarm, Argentina) en concentración 2 %p/v

c) Caldo M17 (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) (en 1 litro de agua destilada)

Componente	Cantidad (g)
Triptona	2,5
Peptona de carne péptica	2,5
Peptona papaínica de soja	5,0
Extracto de levadura	2,5
Extracto de carne	5,0
Lactosa	5,0
Glicerofosfato de sodio	19,0
Sulfato de magnesio	0,25
Ácido ascórbico	0,5

d) Agar M17

Caldo M17 adicionado con agar (Parafarm, Argentina) en concentración 2 %p/v.

e) Caldo nutritivo (en 1 litro de agua destilada)

Componente	Cantidad (g)
Extracto de carne	3
Peptona de carne	5
pH = 7 ±0,2	

f) Agar EMB (en 1 litro de agua destilada)

Componente	Cantidad (g)
Peptona	10
Lactosa	5
Sacarosa	5
K ₂ HPO ₄	2
Eosina 0,4	0,4
Azul de metileno	0,065
Agar	13,5
pH = 7,2 ± 0,2	

g) Caldo LB (en 1 litro de agua destilada)

Componente	Cantidad (g)
Cloruro de sodio 5 g	5
Extracto de levadura 5 g	5
Peptona de caseína 10 g	10
pH = 7,2 ± 0,2	

h) Agar LB

Caldo LB adicionado con agar (Parafarm, Argentina) en concentración 2 % p/v.

i) Agar SF (en 1 litro de agua destilada)

Componente	Cantidad (g)
Digerido pancreático de caseína	20
Dextrosa	5
Fosfato dipotásico	4
Fosfato monopotásico	1,5
Azida sódica	0,5
Cloruro de sodio	5,0
Púrpura de bromocresol	0,032

j) Agar Hektoen entérico (Britania, Argentina) (en 1 litro de agua destilada)

Componente	Cantidad (g)
Proteosa peptona	12,0
Extracto de levadura	3,0
Sales biliares	9,0
Lactosa	12,0
Sacarosa	12,0
Salicina	2,0
Cloruro de sodio	5,0
Tiosulfato de sodio	5,0
Citrato de hierro y amonio	1,5
Azul de bromotimol	0,065
Fucsina ácida	0,1
Agar	14,0
pH = 7,5 ± 0,2	

k) MEDIO A (en 1 litro de agua destilada)

Componente	Cantidad (g)
Leche descremada en polvo	40
Extracto de levadura (o peptona de caseína)	10

l) MEDIO C (en 1 litro de agua destilada)

Componente	Cantidad (g)
Peptona de Caseína	15
Extracto de Levadura	6
Lactosa	15
Cloruro de Sodio	5
Glucosa	15
Tween 80	1
K ₂ HPO ₄	2,5

m) Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) adhesion

Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM), Gibco, Grand Island, N.Y, USA 1000 ml adicionado con:

Componente	Cantidad (ml)
Penicilina/ Streptomina(1000 IU, 1000 µg/ml)	13
Suero fetal bovino	180
Aminoácidos no esenciales	13
Gentamicina (50 mg/ml)	10
Fungizona	5
NaHCO ₃ 2 g/l	
pH = 7 ±0,2	

El suero fetal bovino se inactiva 30 minutos a 60° C. Una vez preparado, el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana con un tamaño de poro de 0,22 µm..

n) Triptona

Triptona 1 g/l

o) Buffer fosfato (en 1 litro de agua destilada)

Componente	Cantidad (ml)
KH ₂ PO ₄ (0,1M)	500
NaOH (0,1M)	291
pH = 7 ± 0,2	

p) Solución de PBS (en 1 litro de agua destilada)

Componente	Cantidad (g)
NaCl	8,02
KCl	0,231
Na ₂ HPO ₄	1,17
KH ₂ PO ₄	0,2
pH = 7 ± 0,2	

q) Solución de jugo gástrico simulado

Componente	Concentración (mM)
NaCl	125
KCl	7
NaHCO ₃	45
pH= 3 (con 1 HCl 1M)	

Posteriormente a la esterilización por autoclave, se adicionó una suspensión de 3 mg/ml de pepsina (Sigma-Aldrich, Alemania), esterilizada por filtración a través de una membrana con un tamaño de poro de 0,22 µm.

r) Solución de jugo intestinal simulado

Componente	Concentración (mM)
NaCl	22
KCl	32,7
NaHCO ₃	7,6
pH 8,0	

Posteriormente a la esterilización por autoclave, se adicionó una suspensión de 1 mg/ml de pancreatina (Sigma-Aldrich, Alemania) y 7% v/v de bilis de buey (Merck, Alemania), esterilizadas por filtración a través de una membrana con un tamaño de poro de 0,22 µm.

s) Medio API CHL (presentación comercial: ampollas de 10 ml)

Componente	Cantidad (g)
Polipeptona (origen ovino/porcino)	10
Extracto de levadura	5
Tween 80	1
Fosfato dipotásico	2
Acetato sódico	5
Citrato diamónico	2
Sulfato de magnesio	0,20
Sulfato de manganeso	0,05
Púrpura de bromocresol	0,017
Agua desmineralizada 1000 ml	
pH= 6,7-7,1	

t) Gel de agarosa al 1,2%

Componente	Cantidad
Agarosa	1,2 g
Bromuro de etidio	3 µl
Buffer TAE (TRIS-Ácido acético-EDTA) 1%	100 ml

2. Coloraciones

Tinción de Gram

Cristal violeta: 10 g/l en agua destilada.

Safranina (solución madre): 25 g/l en etanol.

Safranina (solución de trabajo): solución madre diluida 1/10.

Lugol: 10 g I₂ + 20 g KI en 1 litro de agua destilada.

Decolorante: etanol-acetona 4:1.

Las soluciones se filtran antes de utilizarlas.

Protocolo:

Tiempo de exposición (seg)

Cristal violeta: 60

Lavar con agua

Lugol: 60

Lavar con agua

Decolorante: 15

Lavar con agua

Safranina: 60

Apéndice 2

1. Determinación de la composición de ácidos orgánicos de los sobrenadantes libres de células de los aislados

a. Preparación de soluciones patrón y obtención de curvas estándar de calibración

Para la determinación de la concentración de ácidos orgánicos en los sobrenadantes por HPLC, se prepararon diferentes soluciones patrón de concentración conocida con soluciones estándar de ácido láctico, ácido acético y ácido propiónico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). La composición de cada solución patrón se presenta en la siguiente **Tabla**.

Tabla. Composición de soluciones patrón preparadas a partir de soluciones estándar de ácido láctico, ácido acético y ácido propiónico.

CONCENTRACIÓN (ppm)	Patrón 1	Patrón 2	Patrón 3	Patrón 4	Patrón 5	Patrón 6
Ácido Láctico	2.540,00	1.016,00	508,00	254,00	101,60	50,80
Ácido Acético	1.027,00	513,50	256,75	2.567,50	51,35	102,70
Ácido Propiónico	513,50	256,75	2.567,50	1.027,00	102,70	51,35

A partir de la medida de estas soluciones por la técnica HPLC, se obtuvieron las siguientes curvas de calibración para cada ácido (**Figura A**, **Figura B** y **Figura C**).

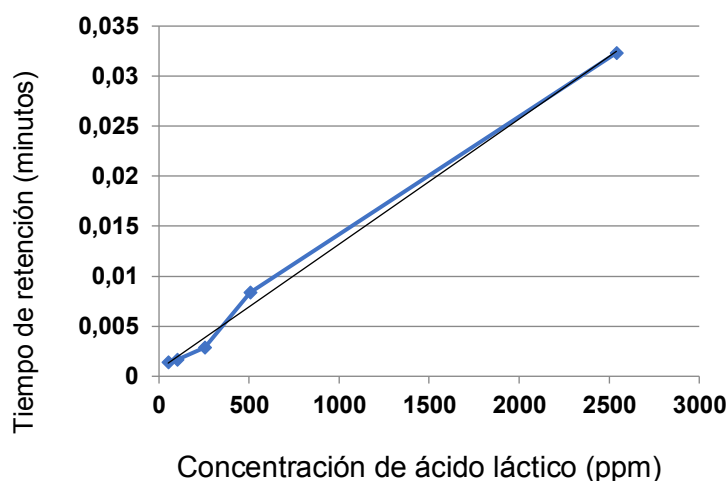


Figura A. Curva de calibración obtenida con una solución estándar de ácido láctico, ajustada a la ecuación lineal

$$\text{Tiempo de retención (min)} = 1 \times 10^{-5} \times \text{Concentración (ppm)} + 0,0007 \quad (R^2 = 0,9957)$$

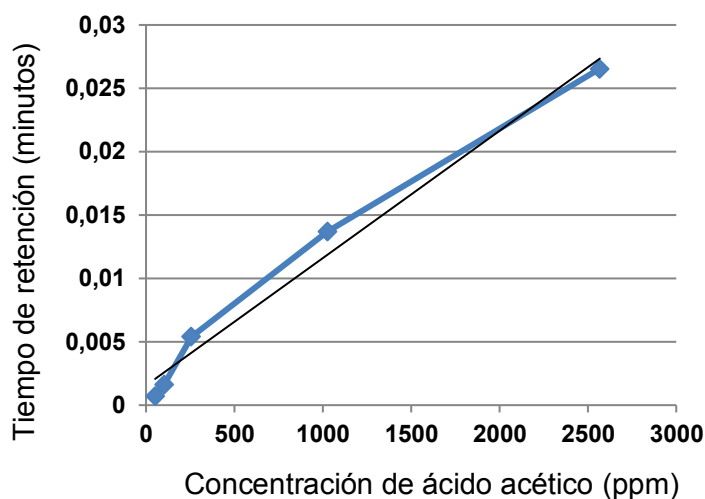


Figura B. Curva de calibración obtenida con una solución estándar de ácido acético, ajustada a la ecuación lineal

Tiempo de retención (min)= 1×10^{-5} x Concentración (ppm) + 0,0016 ($R^2= 0,9818$)

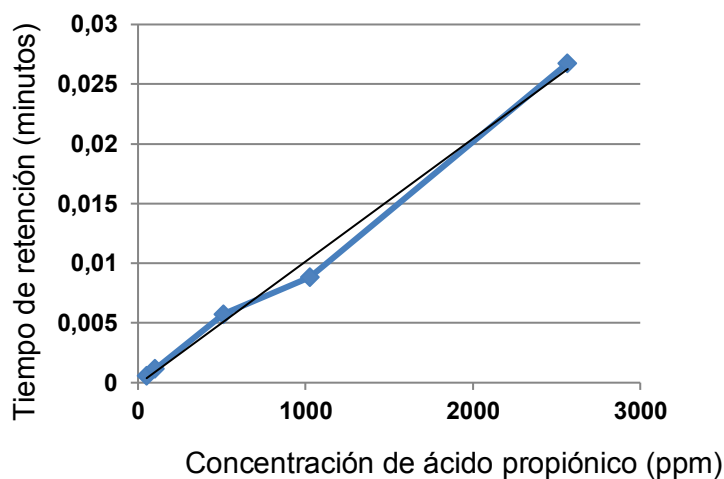


Figura C. Curva de calibración obtenida con una solución estándar de ácido propiónico ajustada a la ecuación lineal

Tiempo de retención (min)= 1×10^{-5} x Concentración (ppm) -0,0002 ($R^2= 0,9929$)

A continuación, se observan como ejemplos los cromatogramas obtenidos para uno de los patrones utilizados (Patrón 1, **Figura D**) y una muestra evaluada (*L. salivarius* CM-CIDCA 1234C, en caldo MRS, dilución 1/5, **Figura E**). En las primeras imágenes se observan los picos y los tiempos de retención y, en las segundas imágenes, el área bajo los picos.

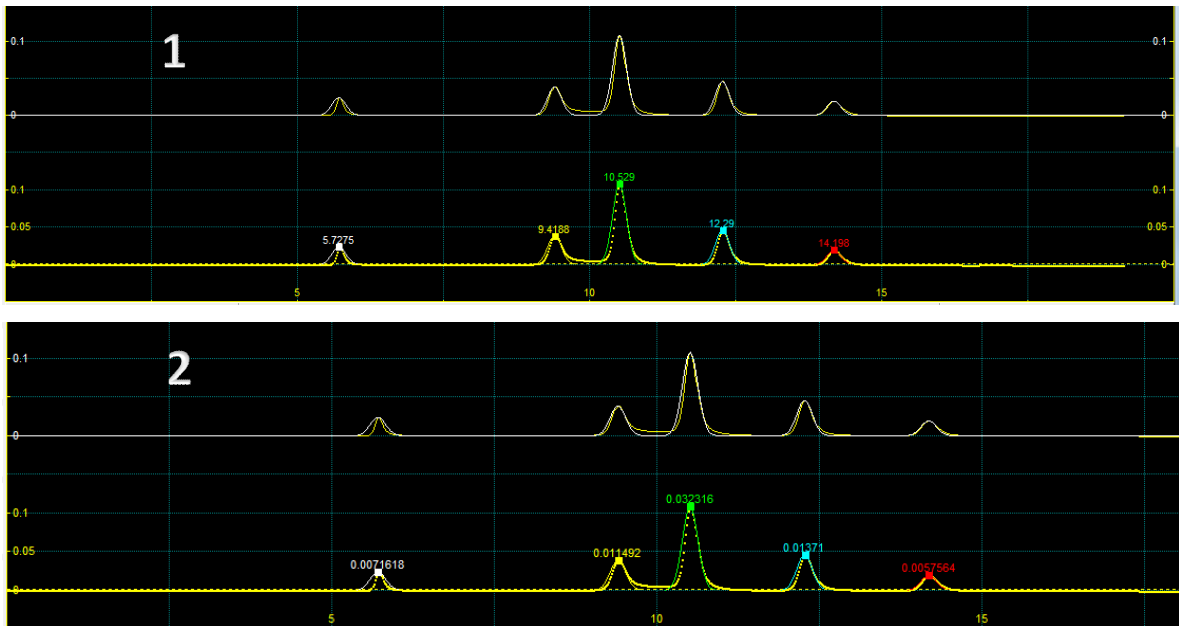


Figura D. Cromatograma obtenido para el patrón 1, donde se observan los tiempos de retención (1) y el área bajo la curva (2).

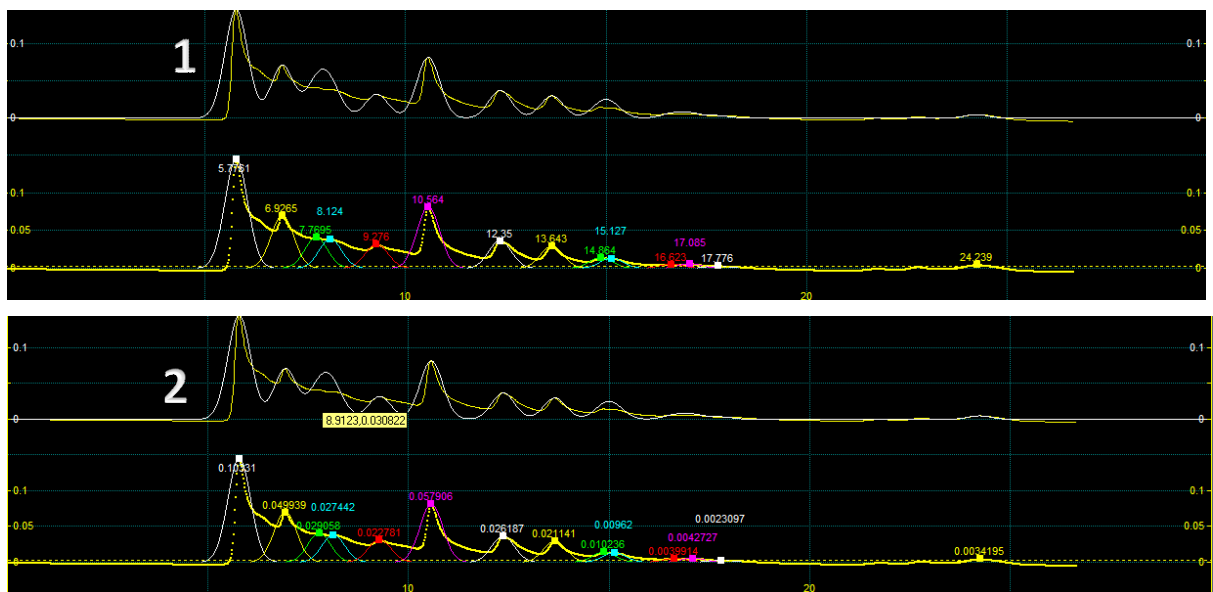


Figura E. Cromatograma obtenido para el *L. salivarius* CM-CIDCA 1234C (medio de cultivo: MRS, D 1/5), donde se observan los tiempos de retención (1) y el área bajo la curva (2).

2. Tabla en correlación con la Sección 3.3.4.2.3- Contenido de materia grasa total (en base seca, BS) de hígados de pollos de 44 días de vida (al final del ciclo de crianza).

GRUPO	Materia grasa total (%), en BS	DE	Promedio	DE
Control	10,2	0,1358	11,8475^{a,b}	2,15207458
Control	11,66	0,1751		
Control	14,94	0,7169		
Control	10,59	0,4919		
Tricepa	8,32	0,4026	9,305^a	0,8199796
Tricepa	9,38	0,3725		
Tricepa	10,32	0,4503		
Tricepa	9,2	0,4515		
Lp 83114 10 ⁵	15,52	0,3453	12,8175^b	1,9402298
Lp 83114 10 ⁵	11,07	0,2106		
Lp 83114 10 ⁵	11,85	0,5825		
Lp 83114 10 ⁵	12,83	0,4319		
Lp 83114 10 ⁸	10,46	0,4426	10,55^{a,b}	1,06088014
Lp 83114 10 ⁸	11,52	0,5531		
Lp 83114 10 ⁸	11,12	0,5509		
Lp 83114 10 ⁸	9,1	0,4171		

Evaluación estadística: ANOVA de un solo factor, test de Tukey para comparaciones múltiples, $\alpha = 0,05$. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los aislados tratamientos ($p < 0,05$). BS (base seca): Determinado en base al peso seco por método de extracción con solvente. DE: desviación estándar.

3. Tabla en correlación con la Sección 3.3.4.2.6-

Peso promedio (a partir del pesaje de un grupo de pollos) en función de los días de vida de los animales pertenecientes al grupo control (■), tratamiento con producto probiótico *tricepsa* 10^7 UFC/ml (■), tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10^5 UFC/ml (■) y tratamiento con *L. plantarum* CIDCA 83114 10^8 UFC/ml (■). Adicionalmente, se graficaron los valores pertenecientes a los animales del galpón (■). Evaluación estadística: ANOVA de dos factores, test de Bonferroni para comparaciones múltiples, $\alpha = 0,05$.

Edad del pollo	Grupo 10^7 UFC/ml <i>tricepsa</i> (Kg)	Grupo 10^8 UFC/ml Lp 83114 (Kg)	Grupo 10^5 UFC/ml Lp 83114 (Kg)	Grupo Control (Kg)	GALPÓN (Kg)
Día 0	0,0467	0,0478	0,0467	0,0462	
Día 7	0,1616±0,1319	0,1609±0,1335	0,1586±0,1170	0,1467±0,0009	0,1639±0,1816
Día 16	0,398±0,020	0,378±0,013	0,3645±0,0073	0,381±0,038	0,463±0,022
Día 23	0,8046±0,0516	0,8184±0,0611	0,7668±0,0350	0,7507±0,0187	0,8385±0,0177
Día 28	1,1029±0,0962	1,1154±0,0558	1,0940±0,0880	1,0547±0,0648	1,1544±0,0195
Día 32	1,3976±0,0779	1,4635±0,0411	1,4062±0,1245	1,3502±0,1823	1,4533±0,0871
Día 44	2,6372±0,2868	2,5401±0,3181	2,6676±0,2025	2,5635±0,2791	2,5189±0,4942

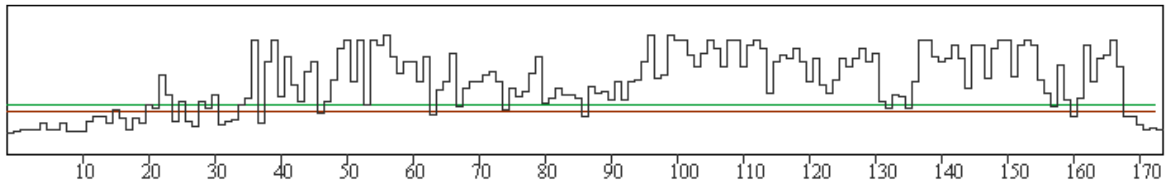
4. Secuencias obtenidas a partir de la amplificación de fragmentos de ADN comprendidos entre los primers 338f y 518r y gráficos de calidad de los aislados bacterianos B1, Y1, C2, C5 Y C9 del tracto gastrointestinal de pollo, correspondientes a la Sección 1.3.3 del Capítulo 1

-Aislado B1: 338f, 175pb

```

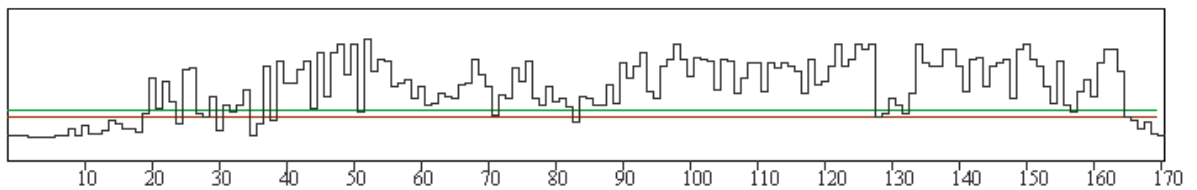
GCGTCATTACCTGGACGCCGTCTGATGGCAGCCCTGCCGCGTGAGTGAAG
AAGGTCTTCGGATCTGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAG
AGTAACTGTTCAATTCGATGACGGTATCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTGA

```



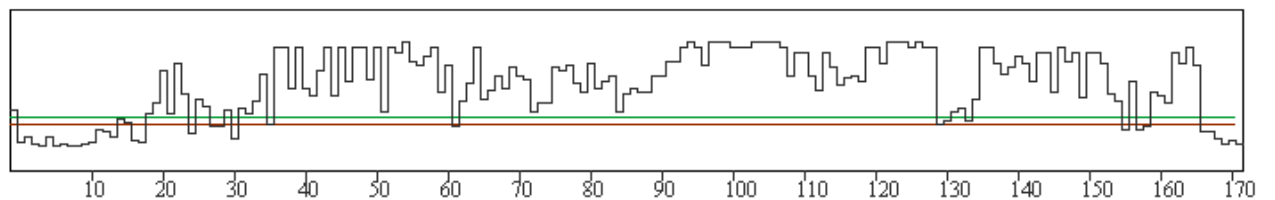
-Aislado Y1: 338f, 172pb

CCGTCTTACATGGACGCAAGTCTGATGGAGCCCGCCGCGTGAGTGAAGAA
 GGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGT
 AACTGTTCAATTCGATGACGGTATCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTACG
 TGCCAGCAGCCGCGGTAATAGA



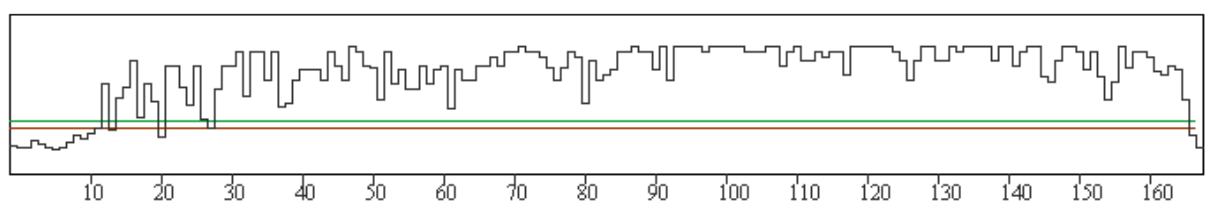
- Aislado C2: 338f, 173 pb

GGGGTGCCATGGACGCAAGTCTGATGGAGCCCGCCGCGTGAGTGAAGAA
 GGTCTTCGGATCTGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAG
 TAACTGTTCAATTCGATGACGGTATCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTAC
 GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTGA



- Aislado C5: 338f, 169 pb

AGATTCATGGACGAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGG
 TTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAAC
 TGTTCAAGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC
 CAGCAGCCGCGGTAATAAA



**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

- Aalaei M, Khatibjoo A, Zaghari M, Taherpou K, Akbari-Gharaei M, Soltani M (2019). Effect of single- and multi-strain probiotics on broiler breeder performance, immunity and intestinal toll-like receptors expression. *Journal of Applied Animal Research*, 47(1): 236-242.
- Aarestrup FM (2000). Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. *APMIS Supplementum*, 108:5-48.
- Aarestrup FM (2015). The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370(1670), 20140085. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0085>
- Aazami N, Kalantar E, Poormazaheri H, Setayesh vali pour N, Salehi Jouzan G (2016). Selection and characterization of potential probiotic *Lactobacilli* spp isolated from chicken feces may be used as a potent antibacterial agent. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 35(1): 50-57.
- Abbas Hilmi HT, Surakka A, Apajalahti J, Saris PE (2007). Identification of the most abundant lactobacillus species in the crop of 1-and 5-week- old broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:7867-Crit7873.
- Abdel-Daim A, Hassouna N, Hafez M, Ashor MS, Aboulwafa MM (2013). Antagonistic activity of *Lactobacillus* isolates against *Salmonella typhi* in vitro. *BioMed Research International*. 2013:680605. doi: 10.1155/2013/680605.
- Abdel-Hamid MS, Anis A, Elbawab RH, Mohammed AAB, Orabi SH, Fathalla SI (2018). Distinctive antagonistic role of new *Enterococcus faecium* ER-3M strain and its bacteriocin effect against *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 29: 675-690. <https://doi.org/10.1007/s12210-018-0722-7>
- Adams MR & Hall CJ (1988). Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science and Technology*, 23: 87- 292.
- Adetoye A, Pinloche E, Adeniyi BA, Ayeni FA (2018). Characterization and anti-salmonella activities of lactic acid bacteria isolated from cattle faeces. *BMC Microbiology*, 18: 96. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1248-y>
- Adhikari PA & Kim WK (2017). Overview of prebiotics and probiotics: focus on performance, gut health and immunity—a review. *Annals of Animal Science*, 17(4): 949-966.
- Adji AV, Plumeriastuti H, Ma'ruf A, Legowo D (2019). Histopathological Alterations of Ceca in Broiler Chickens (*Gallus gallus*) Exposed to Chronic Heat Stress. *World's Veterinary Journal*. 9(3): 211-217.
- Afsharmanesh M & Sadaghi B (2014). Effects of dietary alternatives (probiotic, green tea powder, and Kombucha tea) as antimicrobial growth promoters on growth, ileal nutrient digestibility, blood parameters, and immune response of broiler chickens. *Comparative Clinical Pathology*, 23(3). DOI: 10.1007/s00580-013-1676-x
- Aguirre-Ezkauriatza EJ, Aguilar-Yáñez JM, Ramírez-Medrano A, Alvarez MM (2010). Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. *Bioresource Technology*, 101(8):2837-2844. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.047.
- Ahmad I (2006). Effect of probiotics on broilers performance. *International Journal of Poultry Science*, 5: 593-597.
- Akbas MY (2015). Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. In: Méndez-Vilas A, ed. *The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs*. Badajoz: Formatex, 383-394.
- Alagawany M, Elnesr SS, Farag MR (2018). The role of exogenous enzymes in promoting growth and improving nutrient digestibility in poultry. *Iranian journal of veterinary research*, 19(3), 157-164.
- Alakomi HL, Skytta E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM (2000). Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5): 2001-2005.

- Alkhalf A & Alhaj M (2010). Influence of probiotic supplementation on blood parameters and growth performance in broiler chickens. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17(3): 219-225.
- Alvarez MT, Ledesma N, Téllez G, Molinari JL, Tato P (2003). Comparison of the immune responses against *Salmonella enterica* serovar Gallinarum infection between naked neck chickens and a commercial chicken line. *Avian Pathology*, 32(2): 193-203.
- Amrane A (2000). Effect of inorganic phosphate on lactate production by *Lactobacillus helveticus* grown on supplemented whey permeate. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 75(3): 223-228. doi:10.1002/(sici)1097-4660(200003)75:3<223::aid-jctb205>3.0.co;2-5
- Amrutha B, Sundar K, Shetty PH (2017). Effect of organic acids on biofilm formation and quorum signaling of pathogens from fresh fruits and vegetables. *Microbial Pathogenesis*, 111: 156-162. DOI 10.1016/j.micpath.2017.08.042.
- Angulo FJ, Johnson KR, Tauxe RV, Cohen ML (2000). Origins and consequences of antimicrobial resistant non typhoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. *Microbiology Drug Resistance*, 6: 77-83.
- Antunes P, Mourão J, Campos J, Peixe L (2016). Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2): 110-121.
- Apajalahti J, Kettunen A, Graham H (2004). Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poultry Science Journal*, 60:223-32. doi: 10.1079/WPS20040017
- Apata D (2008). Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88:1253-1258. DOI: 10.1002/jfsa.3214
- Arai T, Obuchi S, Eguchi K, Seto Y (2016). *In vitro* investigation of molecules involved in *Lactobacillus gasseri* SBT2055 adhesion to host intestinal tract components. *Journal of Applied Microbiology*, 120: 1658-1667. doi:10.1111/jam.13137
- Arena MP, Silvain A, Normanno G, Grieco F, Drider D, Spano G, Fiocco D (2016). Use of *Lactobacillus plantarum* Strains as a Bio-Control Strategy against Food-Borne Pathogenic Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00464
- Asai T, Kojima A, Harada K, Ishihara K, Takahashi T, Tamura Y (2005). Correlation between the usage volume of veterinary therapeutic antimicrobials and resistance in *Escherichia coli* isolated from the feces of food-producing animals in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 58: 369-372.
- Ashraf M, Arshad M, Siddique M, Muhammad G (2009). *In vitro* screening of locally isolated *Lactobacillus* species for probiotics properties. *Pakistan Veterinary Journal*, 29:186-190.
- Atela JA, Mlambo V, Mnisi CV (2019). A multi-strain probiotic administered via drinking water enhances feed conversion efficiency and meat quality traits in indigenous chickens. *Animal Nutrition*, 5(2):179-184.
- Attia Y, Ellakany HF, Abd El-Hamid AE, Fulvia Bovera, Ghazaly SA (2012) "Control of *Salmonella enteritidis* infection in male layer chickens by acetic acid and/or prebiotics, probiotics and antibiotics", *Archiv für Geflügelkunde*, 76(4), pp. 239-245.
- Audisio MC & Apella MC (2006). Bacteriocin-like Substance Produced by *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* CRL1384 with Anti-*Listeria* and Anti-*Salmonella* Effects. *Research Journal of Microbiology*, 1: 61-69.
- Audisio MC, Oliver G, Apella MC (1999). Antagonistic Effect of *Enterococcus faecium* J96 against Human and Poultry Pathogenic *Salmonella* spp. *Journal of Food Protection*, 62(7): 751-755. doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.7.751>
- Avicultura.com, Equipo de redacción (2019). "Importancia del desarrollo del apetito en los pollitos". Artículo publicado en SELECCIONES AVICOLAS N°718, sección de Producción De Carne, por parte del Servicio Técnico Cobb Europa. <https://avicultura.com/desarrollo-apetito-en-pollitos-broiler/> (último acceso: 8/4/2020).

- Ávila J, Ávila M, Tovar B, Brizuela M, Perazzo Y, Hernández H (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Rev Científica Universidad de Zulia-Venezuela*, 20(2):161-169.
- Awad W, Ghareeb K, Böhm J (2008). Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a synbiotic containing *Enterococcus faecium* and oligosaccharides. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(11): 2205-16. doi: 10.3390/ijms9112205.
- Awad WA, Buhm J, Razzazi- Fazeli, Ghareeb K, and Zentek J (2006). Effect of Addition of Probiotic Microorganism to Broiler Diets Contaminated with Deoxynivalenol on Performance and Histological Alterations of Intestinal villi of Broiler Chickens. *Poultry Science*, 85: 974-979.
- Ayeni FA, Sánchez B, Adeniyi BA, Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Ruas-Madiedo P (2011). Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. *International Journal of Food Microbiology*, 147(2):97-104. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.014
- Aziz G, Fakhar H, Rahman S, Tariq M, Zaidi A (2019). An assessment of the aggregation and probiotic characteristics of *Lactobacillus* species isolated from native (desi) chicken gut. *The Journal of Applied Poultry Research*, 28(4): 846-857, <https://doi.org/10.3382/japr/pfz042>
- Baccigalupi L, Di Donato A, Parlato M, Luongo D, Carbone V, Rossi M, Ricca E, De Felice M (2005). Small surface associated factors mediate adhesion of a food-isolated strain of *Lactobacillus fermentum* to Caco-2 cells. *Research in Microbiology*, 156(7): 830-836.
- Ballou AL, Ali RA, Mendoza MA, Ellis JC, Hassan HM., Croom Wj, Koci MD nether(2016). Development of the chick microbiome: how early exposure influences future microbial diversity. *Frontiers in Veterinary Science*, 3:2. 10.3389/fvets.2016.00002
- Baltic BM, Janjic J, Brankovic Lazic I, Mrdovic B, Ciric J, Markovic R, Mitrovic R (2019). Relationships between broiler final weights and microbiota of certain segments of the intestine. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science* 333:012045. DOI: 10.1088/1755-1315/333/1/012045
- Bannerjee P & Pradha NR (2006). Yeast a good alternative for antibiotic growthpromoters in broiler chicken. *World Poultry*, 22(8):32-34.
- Barrow PA & Freitas Neto OC (2011). Pullorum disease and fowl typhoid—new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathology*, 40(1):1-13. doi: 10.1080/03079457.2010.542575.
- Barton MD (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews*, 13(2):279-99. doi: 10.1079/095442200108729106.
- Basualdo JA, Coto CE; De Torres RA (2006). Tinción de Gram, pp.59. En: *Microbiología biomédica* (ed) Atlante Argentina, Buenos Aires.
- Bellhorn T & Macintire DK (2004). Bacterial translocation. *Compendium On Continuing Education For The Practising Veterinarian-North American Edition-*, 26(3):229-235.
- Benaissa M, Zadi-Karam H, Karam N (2017). Development of a sweet whey-based medium for culture of *Lactobacillus*. *African Journal of Biotechnology*, 16(30):1630-1637.
- Bera AK, Bhattacharya D, Pan D, Dhara A, Kumar S, Das S (2010). Evaluation of economic losses due to coccidiosis in poultry industry in India. *Agricultural Economics Research Review*, 23: 91-96.
- Berchieri JrA, Oliveira GH, Pinheiro LAS, Barrow PA (2000). Experimental *Salmonella Gallinarum* infection in light laying hen lines. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(1):50-52.
- Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S, Gueguen M (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126:278-285.
- Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL (1994). *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*, 35:483-489.
- Biloni CF, Quintana A, Menconi G, Kallapura J, Latorre C, Pixley S, Layton M, Dalmagro X, Hernandez-Velasco A, Wolfenden BM, Hargis G, Tellez (2013). Evaluation of effects of EarlyBird

- associated with FloraMax-B11 on *Salmonella* Enteritidis, intestinal morphology, and performance of broiler chickens. *Poultry Science*, 92 (9): 2337-2346.
- Binek M, Borzemska W, Pisarski R, Blaszczyk B, Kosowska G, Malec H, Karpinska E (2000). Evaluation of the efficacy of feed providing on development of gastrointestinal microflora of newly hatched broiler chickens. *Archiv fur Geflugelkunde*, 64:147-151.
 - Bitterncourt LC, Silva CC, Garcia PDSR, Zanardo DCZ, Albuquerque R, Araújo LF (2011). Influence of a probiotic on broiler performance. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40:2739-2743.
 - Blajman J (2017). Trabajo de Tesis doctoral: “Desarrollo de un inóculo probiótico para pollos parrilleros y monitoreo durante su tránsito intestinal y en órganos del medio interno” Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina. <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/handle/11185/925> (último acceso: 8/4/2020).
 - Blajman JE, Frizzo LS, Zbrun MV, Astesana DM, Fusari ML, Soto LP, Rosmini MR, Signorini ML (2014). Probiotics and broiler growth performance: a meta-analysis of randomised controlled trials. *British Poultry Science*, 55(4):483-494.
 - Bolla PA, Serradell MA, de Urraza PJ, De Antoni GL (2011). Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *Journal of Dairy Research*, 78: 15-22.
 - Bolsa de Comercio de Rosario (2019). “Con fuerte aumento de la demanda china, la carne aviar marca records de producción y comercio global” AÑO XXXVII - N° Edición 1929 - 01 de Noviembre de 2019 <https://bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/con-fuerte> (último acceso: 8/4/2020).
 - Bolton DJ (2015). *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiology*, 48: 99–108. Doi:10.1016/j.fm.2014.11.017
 - Booth IR (1985). Regulation of Cytoplasmic pH in Bacteria. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, 49(4): 359-378.
 - Bouchard DS, Seridan B, Saraoui T, Rault L, Germon P, Gonzalez-Moreno C, Nader-Macias FM, Baud D, François P, Chuat V, Chain F, Langella P, Nicoli J, Le Loir Y, Even S (2015). Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Mammary Microbiota: Potential Allies against Bovine Mastitis. *PLoS One*, 29; 10(12):e0144831. doi: 10.1371/journal.pone.0144831.
 - Bracey D, Holyoak CD, Coote PJ (1998). Comparison of the inhibitory effect of sorbic acid and amphotericin B on *Saccharomyces cerevisiae*: is growth inhibition dependent on reduced intracellular pH. *Journal of Applied Microbiology*, 85(6): 1056-1066.
 - Braun JP & Lefebvre HP (2008). Kidney Function and Damage, in *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, pp. 485-528.
 - Braykov NP, Eisenberg JNS, Grossman M, Zhang L, Vasco K, Cevallos W, Muñoz D, Acevedo A, Moser KA, Marrs CF, Foxman B, Trostle J, Trueba G, Levy K (2016). Antibiotic resistance in animal and environmental samples associated with small-scale poultry farming in northwestern Ecuador. *mSphere* 1(1):e00021-15. doi:10.1128/mSphere.00021-15.
 - Brisbin JT, Gong J, Parvizi P, Sharif S (2010). Effects of lactobacilli on cytokine expression by chicken spleen and cecal tonsil cells. *Clinical and vaccine immunology*, 17(9):1337-1343. <https://doi.org/10.1128/CVI.00143-10>
 - Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F (2003). Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effect so flesh well known antibiotic son gram-positive bacteria. *Clinical Microbiological Reviews*, 16: 175-188.
 - Cadieux PA, Burton J, Devillard E, Reid G (2009). Lactobacillus by-products inhibit the growth and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 60: 13-8.
 - Callaway TR, Edrington TS, Anderson RC, Byrd JA, Nisbet DJ (2008). Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. *Journal of Animal Science*, 86(14):163-172. 10.2527/jas.2007-0457
 - Candela M, Perna F, Carnevali P, Vitali B, Ciati R, Gionchetti P, Rizzello F, Campieri M, Brigidi P (2008). Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal

- epithelial cells: Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International Journal of Food Microbiology*, 125(3):286-292. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.012
- Cao GT, Zeng XF, Chen AG, Zhou L, Zhang L, Xiao XP, Yang CM (2013). Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Poultry Science*, 92(11): 2949-2955.
 - Cao Li, Li C, Yang XJ, Li ZJ, Sun FF, Wu XH, Yao JH (2012). Reduced lesions in chickens with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis by *Lactobacillus fermentum* 1.20291. *Poultry Science*, 91(12): 3065-3071. doi: 10.3382/ps.2012-02548
 - Capasso C & Supuran CT (2015). Bacterial, fungal and protozoan carbonic anhydrases as drug targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 19(12): 1689-1704.
 - Caro Velez CA & Peláez ÁML (2015). Capacidad antifúngica de sobrenadantes libres de células obtenidos de la fermentación de un sustrato de "panela" con gránulos de kéfir de agua. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), p 22.
 - Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14: 835-847.
 - Carvalho IT & Santos L (2016). Antibiotics in the aquatic environments: a review of the European scenario. *Environment International*, 94: 736-757.
 - Casey P, Casey G, Gardiner G, Tangney M, Stanton C, Ross R, Hill C, Fitzgerald G (2004). Isolation and characterization of anti-*Salmonella* lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract. *Letters in Applied Microbiology*, 39:431-438. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01603.x.
 - Caspary WF (1992). Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55(1): 299S-308S.
 - Cassenego APV, d'Azevedo PA, Ribeiro AML, Frazzon J, Sand ST Van Der, Frazzon APG (2011). Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp and fed with diets containing different supplements. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2):480-488.
 - Castanon JI (2007). History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science*, 86(11): 2466-71.
 - Castelijn GAA, Parabirsing JA, Zwietering MH, Moezelaar R, Abee T (2013). Surface behaviour of *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Brandenburg* and *S. Infantis*. *Veterinary Microbiology*, 161: 305-314.
 - Cejas L, Romano NG, Moretti A, Mobili P, Golowczyc MA, Gomez-Zavaglia A (2017). Malt sprout, an underused beer by-product with promising potential for the growth and dehydration of lactobacilli strains; Association of Food Scientists and Technologists of India; *Journal of Food Science and Technology*, 541(3): 4464-4472.
 - Genesiz S, Yaman H, Ozcan A, Karademir G (2008). Effects of kefir as a probiotic on serum cholesterol, total lipid, aspartat e amino transferase and alanine amino transferase activities in broiler chicks. *Medycyna Weterynaryjna*, 64(2): 168-170.
 - Center for Disease Control-CDC (2016). Making food safer to eat: reducing contamination from the farm to the table. <http://www.cdc.gov/vitalsigns/foodsafety/> (último acceso: 8/4/2020).
 - Chacana PA & Terzolo HR (2003). Revisión sobre Pullorosis y Tifosis aviar. Nuevos enfoques para viejos conceptos. Departamento de Producción Animal, INTA EEA Balcarce, Argentina. https://www.researchgate.net/profile/Horacio_Terzolo/publication/281241627_Pullorosis_y_Tifosis_aviar/links/55dc95da08aed6a199adfd5a.pdf (último acceso: 8/4/2020).
 - Chambers JR & Gong J (2011). The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. *Food Research International*, 44(10): 3149-3159. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.017>.

- Chapman C, Gibson G, Rowland I (2014). Effects of single- and multi-strain probiotics on biofilm formation and *in vitro* adhesion to bladder cells by urinary tract. *Anaerobe*, 27: 71-76.
- Chaucheyras-Durand F & Durand H (2010). Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes*, 1(1): 3-9. doi: 10.3920/BM2008.1002
- Chauvière G, Coconnier MH, Kernéis S, Darfeuille-Michaud A, Joly B, Servin AL (1992). Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) from human enterocyte-like Caco-2 cells by heat-killed *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Letters*, 70(3):213-217.
- Chauvière G, Coconnier MH, Kernéis S, Fourniat J, Servin AL (1992). Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Journal of General Microbiology*, 138(8):1689-1696. doi:10.1099/00221287-138-8-1689
- Chaveerach P, Keuzenkamp DA, Lipman LJ, van Knapen F (2004). Effect of organic acids in drinking water for young broilers on campylobacter infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes. *Poultry Science*, 83:330-334.
- Chen CC, Lai CC, Huang HL, Huang WY, Toh HS, Weng TC, Chuang YC, Lu YC, Tang HJ (2019). Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Against Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Frontiers Microbiology*, 10: 789. doi: 10.3389/fmicb.2019.00789
- Chen F, Zhu L, Qiu, H (2017). Isolation and Probiotic Potential of *Lactobacillus Salivarius* and *Pediococcus Pentosaceus* in Specific Pathogen Free Chickens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 19(2): 325-332. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2016-0413>
- Chen J, Peng H, Wang X, Shao F, Yuan Z, Han H (2014). Graphene oxide exhibits broadspectrum antimicrobial activity against bacterial phytopathogens and fungal conidia by intertwining and membrane perturbation, Nanoscale. *The Royal Society of Chemistry*, 6(3): 1879-1889.
- Cheng C, Yang Y, Dong Z, Wang X, Fang C, Yang M, Sun J, Xiao L, Fang W, Song H (2015). *Listeria monocytogenes* varies among strains to maintain intracellular pH homeostasis under stresses by different acids as analyzed by a high-throughput microplate-based fluorometry. *Frontiers in Microbiology*, 6: 15.
- Cherrington CA, Hinton M, Mead GC, Chopra I (1991). Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Advances in Microbial Physiology*, 32:87-108.
- Chian RC (2010). Cryobiology: an overview. *Fertility Cryopreservation* (Chian R-C. Quinn R., eds), pp. 1-9. Cambridge University Press, Cambridge, Montréal.
- Cho JH, Zhang ZF, Kim IH (2013). Effects of single or combined dietary supplementation of β -glucan and kefir on growth performance, blood characteristics and meat quality in broilers. *British Poultry Science*, 54(2): 216-221.
- Choi SW, Ha JS, Kim BY, Lee DH, Park JK, Youn HN, Hong YH, Lee SB, Lee JB, Park SY, Choi IS, Song CS (2014). Prevalence and characterization of *Salmonella* species in entire steps of a single integrated broiler supply chain in Korea. *Poultry Science*, 93(5): 1251-7.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6): 996-1006.
- Cisek AA & Binek M (2014). Chicken intestinal microbiota function with a special emphasis on the role of probiotic bacteria. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 7(2): 385-394.
- Cobb Cares (2018). Sitio web oficial. <https://www.cobb-vantress.com/assets/Cobb-Files/c8850fbe02/6998d7c0-12d1-11e9-9c88-c51e407c53ab.pdf> (último acceso: 8/4/2020).
- Coconnier MH, Bernet MF, Kernéis S, Chauvière G, Fourniat J, Servin AL (1993). Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiology Letters*, 110(3): 299-305.
- Coconnier MH, Lievin V, Lorrot M, Servin AL (2000). Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infecting human enterocyte-like Caco-2/TC-7 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3): 1152-1157.

- Cole MB & Keenan MH (1986). Synergistic effects of weak acid preservatives and pH on the growth of *Zygosaccharomyces bailii*. *Yeast*, 2: 93-100.
- Collado MC, Surono I, Meriluoto J, Salminen S (2007). Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. *Journal of Food Science*, 72: 89-93. 10.1111/j.1750-3841.2007.00294.x
- Coman M, Verdenelli M, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Boyko N, Cresci A (2014). *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501[®], *Lactobacillus paracasei* IMC 502[®] and SYN BIO[®] against pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 117:518-527. doi:10.1111/jam.12544
- Conner DE, Scott YN, Bernard DT (1990). Growth, inhibition and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. *Journal of Food Protection*, 53:652-655.
- Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science*, 70:1-12.
- Correa Franco M (2018). Trabajo de Tesis Doctoral "Desarrollo de una mezcla microbiana para la inclusión como probiótico en la industria avícola: estudio de su acción sobre hongos contaminantes y micotoxinas". Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/66124> (último acceso: 7/4/2020).
- Cortés-Zavaleta O, López-Malo A, Hernández-Mendoza A, García HS (2014). Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *International Journal of Food Microbiology*, 173:30-35.
- Corzo G & Gilliland SE (1999). Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82:472-480.
- Cotter PD & Hill C (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (3):429-453.
- Coughlan LM, Cotter PD, Hill C, Alvarez-Ordóñez A (2016). New weapons to fight old enemies: Novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology*, 18(7): 1641.
- Cox N (2011). "Efecto de las yemas no absorbidas en pollos de engorda sobre la inocuidad alimentaria". Artículo publicado en el sitio web "Industria Avícola". <https://www.industriaavicola.net/enfermedades-y-sanidad/efecto-de-las-yemas-no-absorbidas-en-pollos-de-engorda-sobre-la-inocuidad-alimentaria/> (último acceso: 8/4/2020).
- Crittenden R (2009). Incorporating probiotics into foods. In: Lee Y.L., Salminen S. (eds) *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. 2nd Ed. Wiley, New Jersey: 58-75.
- Crociani J, Grill JP, Huppert M, Ballongue J (1995) Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with in vivo study. *Letters in Applied Microbiology*, 21:146-148
- Cui F, Wan C, Li Y, Liu Z (2012). Co-production of lactic acid and *Lactobacillus rhamnosus* cells from whey permeate with nutrient supplements. *Food and Bioprocess Technology*, 5:1278-1286.
- Cunningham J & Klein B (2014). *Fisiología Veterinaria*. Elsevier Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-84-9022-317-8/00056-7>
- da Rocha AP, Abreu RD, Marques da Costa CM, de Oliveira GJC, Albinati RCB, da Paz AS, Pedreira TM (2010). Prebióticos, ácidos orgânicos e probióticos em rações para frangos de corte. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 11(3).
- Da Silva AS, Boiago MM, Bottari NB, do Carmo GM, Alves MS, Boscato C, Morsch CM, Schetinger MRC, Casagrande RA, Stefani LM (2016). Hepatic cholinesterase of laying hens naturally infected by *Salmonella Gallinarum* (fowl typhoid). *Microbial Pathogenesis*, 98: 93-97.
- Danzeisen JL, Kim HB, Isaacson RE, Tu ZJ, Johnson TJ (2011). Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. *PLOS ONE* 6:e27949. 10.1371/journal.pone.0027949
- Darwin KH & Miller VL (1999). Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. *Clinical Microbiology Reviews*, 12:405-428.

- Das J, Mishra D, Ray P, Tripathy P, Beuria T, Singh N, Suar M (2013). *In vitro* evaluation of anti-infective activity of a *Lactobacillus plantarum* strain against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Gut Pathogens*, 5(1): 11.
- Davies R & Breslin M (2003). Observations on *Salmonella* contamination of commercial laying farms before and after cleaning and disinfection. *Veterinary Record*, 152:283-287.
- De Franceschi M (2019). "Coccidiosis. Cómo se debe diagnosticar". <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/coccidiosis-como-debe-diagnosticar-t43486.htm> (último acceso: 8/4/2020).
- De Franceschi M, Pinto S, Iglesias B. "Estrategias para evaluar alternativas a los promotores de crecimiento". XXII Congreso Latinoamericano de Avicultura, Buenos Aires, 2011. www.engormix.com/MA-avicultura/eventos/xxii-congreso-latinoamericano-avicultura-2011-t1189-conferencias.htm (último acceso: 8/4/2020).
- De Melo Pereira GV, de Oliveira Coelho B, Júnior AIM, Thomaz-Soccol V, Soccol CR (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.09.003
- de Souza LFA, Araújo DN, Stefani LM, Giometti IC, Cruz-Polycarpo VC, Polycarpo G, Burbarelli MF (2018). Probiotics on performance, intestinal morphology and carcass characteristics of broiler chickens raised with lower or higher environmental challenge. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 50(1): 35-41. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-81322018000100107>
- de Valdez GF, de Giori GS, de Ruiz Holgado AP, Oliver G (1985). Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic Acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(2): 413-5.
- Debnam AL; Jackson CR; Avellaneda GE; Barrett JB; Hofacre CL (2005). Effect of growth promotant usage on enterococci species on a poultry farm. *Avian Diseases*, 49(3):361-5.
- Dec M, Nowaczek A, Urban-Chmiel R, Stepién-Pysniak D, Wernicki A (2018). Probiotic potential of *Lactobacillus* isolates of chicken origin with anti-*Campylobacter* activity. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(8):1195–1203.
- Del Bianchi M, Oliveira CA, Albuquerque R, Guerra JL, Correa B (2005). Effects of prolonged oral administration of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in broiler chickens. *Poultry Science*, 84: 1835-1840.
- Desniar, Rusmana I, Suwanto A, Mubarik NR (2020). Organic acid produced by lactic acid bacteria from bekasam as food biopreservatives. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science, 414, 012003. doi:10.1088/1755-1315/414/1/012003
- Deusch S, Tilocca B, Camarinha-Silva A, Seifert J (2015). News in livestock research - use of Omics-technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13:55-63. 10.1016/j.csbj.2014.12.005
- Devriese LA; Baele M, Butaye P (2006). The Genus *Enterococcus*: Taxonomy. *Prokaryotes*, 4:163-174.
- Diarra MF & Malouin F (2014). Antibiotics in canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Frontiers Microbiology*, 5: 282.
- Diarrassouba F, Diarra MS, Bach S, Delaquis P, Pritchard J, Topp E, Skura BJ (2007). Antibiotic resistance and virulence genes incommensal *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from commercial broiler chicken farms. *Journal of Food Protection*, 70: 1316-1327.
- Dias FS, Duarte WF, Schwan RF (2013). Evaluation of adhesive properties of presumptive *Lactobacillus plantarum* strains. *Bioscience Journal*, 29(1): 1678-1686.
- Dibner JJ & Richards JD (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science*, 84: 634-643.
- Dickson JS & Maynard EA (1992). Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: a review. *Journal of Food Protection*, 55: 133-140.

- Dittoe DK, Ricke SC, Kiess AS (2018). Organic Acids and Potential for Modifying the Avian Gastrointestinal Tract and Reducing Pathogens and Disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 216. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00216>
- Dodoo C, Wang J, Basit AW, Stapleton P, Gaisford S (2017). Targeted delivery of probiotics to enhance gastrointestinal stability and intestinal colonization. *International Journal of Pharmaceutics*, 530:224-229.
- Domínguez I. Elanco (2015). Influencia de la integridad intestinal sobre el rendimiento y rentabilidad aviares. Sitio AviNews. <https://avicultura.info/influencia-de-la-integridad-intestinal-sobre-el-rendimiento-y-rentabilidad-aviares/> (último acceso: 8/4/2020).
- Dosuky Atiat S, Nasr FN, Yousef Eman TA, Barakat Olfat S (2019). Bio-production of lactic acid from salted whey and whey permeate. *Plant Archives*, 19(2): 793-798
- Doyle MP & Erickson MC (2011). Opportunities for mitigating pathogen contamination during on-farm food production. *International Journal of Food Microbiology*, 152(3):54-74. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.037
- Drago L, Gismondo MR, Lombardi A, de Haën C, Gozzini L (1997). Inhibition of *in vitro* growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin, *FEMS Microbiology Letters*, 153(2): 455-463. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12610.x>
- Duke GE (1986). Alimentary Canal: Secretion and Digestion, Special Digestive Functions, and Absorption. In: Sturkie P.D. (eds) *Avian Physiology*. Springer, New York, NY.
- Dunislawaska A, Slawinska A, Stadnicka K, Bednarczyk M, Gulewicz P, Jozefiak D, Siwek M (2017). "Synbiotics for broiler chickens-In Vitro design and evaluation of the influence on host and selected microbiota populations following In Ovo delivery.", PloS ONE. *Public Library of Science*, 12(1), p. e0168587. doi: 10.1371/journal.pone.0168587.
- Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Collins JK (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2): 386S-392S.
- Eckert NH, Lee JT, Hyatt D, Stevens SM, Anderson S, Anderson PM, Beltran R, Schatzmayr G, Mohnl M, Caldwell DJ (2010). Influence of probiotic administration by feed or water on growth parameters of broilers reared on medicated and nonmedicated diets. *Journal of Applied Poultry Research*, 19:59-67.
- Edens F, Parkhurstl CR, Casas IA, Dobrogosz WJ (1997). Principles of *Ex Ovo* Competitive Exclusion and *in Ovo* Administration of *Lactobacillus reuteri*. *Poultry Science*, 76(1):179-96. DOI: 10.1093/ps/76.1.179
- EFSA (2007). The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2006. EFSA J. 94. <http://www.efsa.europa.eu> (último acceso: 8/4/2020).
- Eklund T (1980). Inhibition of growth and uptake processes in bacteria by some chemical food preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*, 48: 423-432.
- El-Ghaish S, Ahmadova A, Hadji-Sfaxi I, El Mecherfi K, Bazukyan I, Choiset Y, Rabesona H, Sitohy M, Popov Y, Kuliev A, Mozzi F, Chobert J, Haertlé T (2011). Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Science & Technology*, 22(9): 509-516.
- Embley TM, Faquir N, Bossart W, Collins MD (1989). *Lactobacillus vaginalis* sp. nov. from the Human Vagina. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(3):368-370. doi:10.1099/00207713-39-3-368
- Er S, Erim ÜC, Koç F, Kıvanç M (2019). Identifying probiotic characteristics of *Lactobacillus crispatus* isolated from the vagina. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, e17507. <https://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902019000117507>
- Estrada Pareja M M, Márquez Girón SM, Restrepo Betancur LF (2007). Efecto de la temperatura y la humedad relativa en los parámetros productivos y la transferencia de calor en pollos de engorde. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 20:288-303.

- ESVAC (2017). Seventh Esvac Report. Ema/184855/201. Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 european countries in 2015. Trends from 2010 to 2015. https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2017_en.pdf (último acceso: 8/4/2020).
- Evanikastrri (2003). Trabajo de Tesis Doctoral: "Aislamiento y caracterización de bacterias de ácido láctico de muestras potencialmente clínicas como probióticos". Programa de posgrado, Bogor Agricultural University, Indonesia.
- Ezema C (2013). Probiotics in animal production: A review. *Journal of Veterinary Medicine and Animal*, Vol. 5(11): 308-316, DOI: 10.5897/JVMAH2013.0201
- Fajardo P, Pastrana L, Méndez J, Rodríguez I, Fuciños C, Guerra NP (2012). Effects of feeding of two potentially probiotic preparations from lactic acid bacteria on the performance and faecal microflora of broiler chickens. *The Scientific World Journal*, 562635. <https://doi.org/10.1100/2012/562635>
- FAO/WHO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf> (último acceso: 8/4/2020)
- Faria Filho D, Rosa P, Vieira P, Macari M, Furlan R (2005). Protein levels and environmental temperature effects on carcass characteristics, performance and nitrogen excretion of broiler chickens from 7 to 21 days of age. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 7(4): 247-253.
- Farnell M, Donoghue A, De Los Santos FS, Blore P, Hargis B, Tellez G, Donoghue D (2006). Upregulation of oxidative burst and degranulation in chicken heterophils stimulated with probiotic bacteria. *Poultry Science*, 85:1900-1906.
- Feng J, Wang L, Zhou L, Yang X, Zhao X (2016). Using *In Vitro* Immunomodulatory Properties of Lactic Acid Bacteria for Selection of Probiotics against *Salmonella* Infection in Broiler Chicks. *PLoS ONE*, 11(1): e0147630. doi:10.1371/journal.pone.0147630
- Ferket PR & Gernat AG (2006). Factors that affect feed intake of meat birds: A review. *International Journal of Poultry Science*, 5: 905-911.
- Fernández A, Verde MT, Gascon M, Ramos J, Gomez J, Luco DF, Chavez G (1994). Variations of clinical biochemical parameters of laying hens and broiler chickens fed aflatoxin containing feed. *Avian Pathology*, 23: 37-41.
- Fernández M, Boris S, Barbes C (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 94:449-455.
- Ferreira CL, Grzeskowiak L, Collado MC, Salminen S (2011). In vitro evaluation of *Lactobacillus gasseri* strains of infant origin on adhesion and aggregation of specific pathogens. *Journal of Food Protection*, 74: 1482-1487.
- Filazi A, Yurdakok-Dikmen B, Kuzukiran O, Tansel Sireli U (2017). Mycotoxins in Poultry, *Poultry Science*, Milad Manafi, IntechOpen, DOI: 10.5772/66302. Available from: <https://www.intechopen.com/books/poultry-science/mycotoxins-in-poultry> (último acceso: 8/4/2020).
- Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protocols*. doi: 10.1101/pdb.prot4986.
- Fogh J, Fogh JM, Orfeo T (1977). One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice²³. *Journal of the National Cancer Institute*, 59(1):221-226. doi:10.1093/jnci/59.1.221
- Foley SL, Zhao S, Walker RD (2007). Comparison of Molecular Typing Methods for the Differentiation of *Salmonella* Foodborne Pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(3): 253-276.
- Foltz KL, Ritzi MM, Barrett NW, Evans NP, Collins D, Sriranganathan N, Mahsoub H, Dalloul RA, Sewell J, Persia ME (2017). Efficacy of *Lactobacillus plantarum* supplementation in broilers challenged with avian pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Applied Poultry Research*, 26(3):316-324. <https://doi.org/10.3382/japr/pfw074>.

- Fonseca F, Cenard S, Passot S (2015). Freeze-Drying of Lactic Acid Bacteria. In: Wolkers W., Oldenhof H. (eds) Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 1257. Springer, New York, NY.
- Fox S (1994). Probióticos en la nutrición animal. *Mundo Porcino*, 17:28-32.
- Fracalanza SAP, Scheidegger EMD, Santos PF, Leite PC, Teixeira LM (2007). Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 102 (7):853-859.
- Frankic T, Voljč M, Salobir J, Rezar V (2009). Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta agriculturae Slovenica*, 94:95-102.
- Freese E, Sheu CW, Galliers E (1973). Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, 241: 321-325.
- Freitas Neto OC, Arroyave W, Alessi AC, Fagliari JJ, Berchieri Jr A (2007). Infection of Commercial Laying Hens with *Salmonella* Gallinarum: Clinical, Anatomopathological and Haematological Studies. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 9(2): 133-141.
- Frizzo L, Soto L, Bertozzi E, Sequeira E, Marti L, Rosmini M (2006). Evaluación *in vitro* de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. *Rev FAVE Cienc Vet*, 5:69-80. doi: 10.14409/favecv.v5i1/2.1426
- Fu W & Mathews AP (1999). Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen, *Biochemical Engineering Journal*, 3(3):163–170.
- Fuller BJ (2004). Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*, 25: 375-388.
- Fuller R (1989). Probiotics in man and animal. *Journal of Applied Microbiology*, 66: 365 - 378.
- Gabriel I, Lessire M, Mallet S, Guillot JF (2006). Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. *World's Poultry Science Journal*, 62:499-511.
- Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1): S15-28.
- Gamba R, De Antoni G, Peláez A (2016). Whey permeate fermented with kefir grains shows antifungal effect against *Fusarium graminearum*. *Journal of Dairy Research*, 83(2): 249-255. doi:10.1017/S0022029916000121
- Gamba RR (2015). Trabajo de Tesis Doctoral “Estudio del potencial del kefir como agente antifúngico”. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/45479> (último acceso: 8/4/2020).
- Ganzle MG & Follador R (2012). Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: A review. *Frontiers in Microbiology*, 3, 340.
- Gao P, Ma C, Sun Z, Wang L, Huang S, Su X, Xu J, Zhang H (2017). Feed-additive probiotics accelerate yet antibiotics delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken. *Microbiome*, 5(1):91. doi: 10.1186/s40168-017-0315-1.
- Gao J, Zhang HJ, Yu SH, Wu SG, Yoon I, Quigley J, Gao YP, Qi GH (2008). Effects of Yeast Culture in Broiler Diets on Performance and Immunomodulatory Functions. *Poultry Science*, 87(7): 1377-1384. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00418>.
- Garcia KO, Santana AM, Freitas Neto OC, Simplício KMMG, Alessi AC, Berchieri Jr A, Fagliari JJ (2010). Experimental infection of commercial layers using a *Salmonella enterica* serovar Gallinarum strain: blood serum components and histopathological changes. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 3(2): 111-117.
- García-Cayuela T, Korany AM, Bustos I, de Cadiñanos LPG, Requena T, Peláez C, Martínez-Cuesta MC (2014). Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International*, 57: 44-50. 10.1016/j.foodres.2014.01.010

- Garriga M, Pascual M, Monfort JM, Hugas M (1998). Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *Journal of Applied Microbiology*, 84(1):125-32.
- Garrote GL (1999). Trabajo de Tesis Doctoral: "Bacterias Lácticas y Levaduras para la industria alimentaria: Kefir". Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL (2000). Inhibitory power of kefir: the role of organic acids, *Journal of Food Protection*, 63(3): 364-369.
- Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 68(4): 639-652.
- Garrote GL, Delfederico L, Bibiloni R, Abraham AG, Perez P, Semorile L, De Antoni GL (2004). Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins. *Journal of Dairy Research*, 71: 222-230.
- Gart RK, Holt PS, Nasir MS, Jolley ME, Stone HD (2003). Detection of Salmonella Enteritidis in incubated pools of egg contents by fluorescence polarization and lateral flow immunodiffusion. *Poultry Science*, 82: 687-690.
- Gast RK (2013). Paratyphoid Infections. pp: 693-713, 718-733 in Diseases of Poultry, D. E. Swayne, ed. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
- Gerez C, Torino M, Rollán G, Font de Valdez G (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*, 20:144-148.
- Gerez CL, Torres MJ, Font de Valdez G, Rollán G (2013). Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control*, 64 (3):231-237.
- Ghadban GS (2002). Probiotics in broiler production – a review. *Arch. Geflügelk.* 66:49-58.
- Ghareeb K, Awad WA, Mohnl M, Porta R, Biarnés M, Böhm J, Schatzmayr G (2012). Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Poultry Science*, 91: 1825 - 1832.
- Ghasemi HA, Kasani N, Taherpour K (2014). Effects of black cumin seed (*nigella sativa* L.), a probiotic, a prebiotic and a synbiotic on growth performance, immune response and blood characteristics of male broilers. *Livestock Science*, 164:128-134.
- Gibson DL, White AP, Rajotte CM, Kay WW (2007). AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. *Society for General Microbiology*, 153: 1131-1140. DOI: 10.1099/mic.0.2006/000935-0
- Gibson GR & Roberfroid MB (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125:1401.
- Gibson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK (2013). Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research K. N. *Veterinary Pathology*, 50(6):1007-1015.
- Gil NF, Martinez RCR, Gomes BC, Nomizo A, Martinis ECP De (2010). Vaginal lactobacilli as potential probiotics against *Candida* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(1):6-14. <https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000100002>
- Gilliland SE (1979). Beneficial interrelationships between certain microorganisms and human: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. *Journal of Food Protection*, 42:164-167.
- Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190424/> (ultimo acceso: 8/4/2020).
- Giobergia M (2018). Tesis de grado titulada "Evaluación de resultados productivos en pollos de engorde utilizando diferentes intensidades de luz". Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. Buenos Aires, Argentina. <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/1869/GIOBERGIA%2C%20MARIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (último acceso: 8/4/2020).
- Giraffa G (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26:163-171.

- Golowczyc M (2008). Trabajo de Tesis Doctoral: "Caracterización taxonómica, probiótica y tecnológica de lactobacilos aislados de kefir". Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Golowczyc M, Mobili P, Garrote G, Abraham A, De Antoni G (2007). Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 18:264–273. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.042.
- Golowczyc M, Vera C, Santos M, Guerrero C, Carasi P, Illanes A, Gómez-Zavaglia A, Tymczyszyn E (2013). Use of whey permeate containing in situ synthesised galacto-oligosaccharides for the growth and preservation of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Dairy Research*, 80(03):374-381. doi:10.1017/s0022029913000356
- Golowczyc MA, Gugliada MJ, Hollmann J, Delfederico L, Garrote GL, Abraham A, Semorile L, De Antoni G (2008). Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: Potential use as probiotic. *Journal of Dairy Research*, 75:211-217.
- Golowczyc MA, Silva J, Abraham AG, De Antoni GL, Teixeira P (2009). Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. *Letters in Applied Microbiology*, 50: 7-12
- Golowczyc MA, Silva J, Teixeira P, De Antoni GL, Abraham AG (2011). Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. *International Journal of Food Microbiology*, 144: 556-560.
- Gómez N, Ramiro J, Quecan B, de Melo FB (2016). Use of potential probiotic lactic acid Bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in Microbiology*, 7: 863.
- Gómez-García M, Sol C, de Nova, PJG, Puyalto M, Mesas L, Puente H, Mencía-Ares O, Miranda R, Argüello H, Rubio P, Carvajal A (2019). Antimicrobial activity of a selection of organic acids, their salts and essential oils against swine enteropathogenic bacteria. *Porcine Health Management*, 5: 32. doi:10.1186/s40813-019-0139-4
- Gómez-Zavaglia A, Kociubinski G, Pérez P, De Antoni G (1998). Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. *Journal of Food Protection*, 61(7):865-73.
- Gong J, Yu H, Liu T, Gill JJ, Chambers JR, Wheatcroft R, Sabour PM (2008). Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5): 1372-1382. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03699.x
- Gonzalez Ronquillo M & Angeles Hernandez JC (2017). Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: review of impact and analytical methods. *Food Control*, 72:255-267.
- Gonzalez Siso MI (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A Review. *Bioresource Technol.*, 57:1-11. DOI: 10.1016/0960-8524(96)00036-3.
- Gourama H & Bullerman LB (1995). *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic Fungi of Concern in Foods and Feeds: A Review. *Journal of Food Protection*, 58:1395-1404.
- Gowda S, Desai PB, Hull VV, Math AK, Vernekar SN, Kulkarni SS (2009). A review on laboratory liver function tests. *The Pan African medical journal*, 17 pp.
- Grés MC, Julian B, Bourrié M, Meunier V, Roques C, Berger M, Boulenc X, Berger Y, Fabre G (1998). Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharmaceutical*. DOI 10.1007/s11947-010-0426-1 5: 1278-1286.
- Grimoud J, Durand H, Courtin C, Monsan P, Ouarné F, Theodorou V, Roques C (2010). *In vitro* screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe*, 16(5):493–500. doi:10.1016/j.anaerobe.2010.07.005
- Guan LL, Hagen KE, Tannock WG, Korver DR, Fasnko GM, Allison GE (2003). Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broiler chickens of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:6750-6757.

- Guimarães A, Venancio A, Abrunhosa L (2018). Antifungal effect of organic acids from lactic acid bacteria on *Penicillium nordicum*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1-16. doi:10.1080/19440049.2018.1500718
- Gusils C, Perez-Chaia A, González S, Oliver G (1999). Lactobacilli isolated from chicken intestines: potential use as probiotics. *Journal of Food Protection*, 62:252-256.
- Gutiérrez LA, Bedoya O, Arenas JE (2015). Evaluación de parámetros productivos en pollos de engorde suplementados con microorganismos probióticos. *TEMAS AGRARIOS*, 20(2): 81-85.
- Hall WJ (1964). Tifoidea en la Gallina, En: Enfermedades de las Aves. (Eds.: Biester, C.; Schwarte, M.), Uthea, México, pp. 252-275.
- Hammons S, Oh PL, Martinez I, Clark K, Schlegel VL, Sitorius E, Scheideler SE, Walter J (2010). A small variation in diet influences the *Lactobacillus* strain composition in the crop of broiler chickens. *Systematic and Applied Microbiology*, 33:275-281.
- Hampson DJ (1986). Alteration in piglet small intestinal structure at weaning. *Research in Veterinary Science*, 40: 32-40.
- Hasan S, Hossain MM, Bhuiyan MER (2015). Growth performance and hematobiochemical parameters in broiler during high environmental temperature by the application of symbiotic. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 13(1): 157-162.
- Hashem M & Mohamed MH (2009). Haemato-biochemical and pathological studies on aflatoxicosis and treatment of broiler chicks in Egypt. *Veterinaria italiana*, 45(2): 323-337.
- Hassan HMA, Mohamed MA, Youssef AW, Hassan ER (2010). Effect of using organic acids to substitute antibiotic growth promoters on performance and intestinal microflora of broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23:1348-1353.
- Havelaar AH, van Rosse F, Bucura C, Toetenel MA, Haagsma JA, Kurowicka D, Heesterbeek JH, Speybroeck N, Langelaar MF, van der Giessen JW, Cooke RM, Braks MA (2010). Prioritizing emerging zoonoses in the Netherlands. *PLoS One*. 15;5(11): e13965. doi: 10.1371/journal.pone.0013965.
- He Q, Wang SZ, Leng L, Na W, Wang QG, Li H (2014). Differentially expressed genes in the liver of lean and fat chickens. *Genetics and Molecular Research*, 13(4): 10823– 10828.
- Herbel RS, Vahjen W, Wieler LH, Guenther S (2013). Timely Approaches to Identify Probiotic Species of the Genus *Lactobacillus*. *Gut Pathogens*; 5(1):27. DOI:10.1186/1757-4749-5-27.
- Herrera JM (2018). Trabajo de Tesis de Grado “Evaluación de la protección conferida por *Lactobacillus reuteri* como probiótico en pollos mediante histomorfometría intestinal”. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA, Tandil, Buenos Aires, Argentina. <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/handle/123456789/1687> (último acceso: 8/4/2020).
- Hidayat MN, Malaka R, Agustina L, Pakiding W (2018). Characteristics Isolate Bacteria Lactic Acid of Origin Digestive Tract of Broiler as Probiotic Candidate for Poultry. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 9(2).
- Higgins JP, Higgins SE, Vicente JL, Wolfenden AD, Tellez G, Hargis BM (2007a). Temporal effects of lactic acid bacteria probiotic culture on *Salmonella* in neonatal broilers. *Poultry Science*, 86(8):1662-1666.
- Higgins JP, Higgins SE, Wolfenden AD, Henderson SN, Torres-Rodriguez A, Vicente JL, Hargis BM, Tellez G (2010). Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella* Enteritidis in neonatal broilers. *Poultry Science*, 89(2): 243-247. doi: 10.3382/ps.2009-00436
- Higgins S, Wolfenden A, Tellez G, Hargis B, Porter T (2011). Transcriptional profiling of cecal gene expression in probiotic-and *Salmonella*-challenged neonatal chicks. *Poultry Science*, 90: 901-913. 10.3382/ps.2010-0090
- Higgins SE, Erf GF, Higgins JP, Henderson SN, Wolfenden AD, Gaona-Ramirez G, Hargis BM (2007b). Effect of probiotic treatment in broiler chicks on intestinal macrophage numbers and phagocytosis of *Salmonella enteritidis* by abdominal exudate cells, *Poultry Science*, 86(11):2315-2321.

- Higgins SE, Higgins JP, Wolfenden AD, Henderson SN, Torres-Rodriguez A, Tellez G, Hargis B (2008). Evaluation of a *Lactobacillus*-based probiotic culture for the reduction of *Salmonella* enteritidis in neonatal broiler chicks. *Poultry Science*, 87(1): 27-31. doi: 10.3382/ps.2007-00210
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11:506-514.
- Hill MJ (1982). Gut flora associated diseases in man. *Journal of Veterinary Medicine*, 33:32-36.
- Hofvendahl K & Hahn-Hägerdal B (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 26:87-107.
- Hood SK & Zotolla EA (1988). Effect of low pH on the viability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *Journal of Food Science*, 53:1514-1516.
- Horrocks SM, Anderson RC, Nisbet DJ, Ricke SC (2009). Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Anaerobe*, 15: 8-25. 10.1016/j.anaerobe.2008.09.001
- Hossain MA & Islam MA (2004). Seroprevalence e mortality in chicken caused by pullorum disease and fowl typhoid in certain government poultry farm in Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 2(2): 103-106.
- Hrnčár C, Weis J, Mindek S, Bujko J (2014). Effect of Probiotic Addition in Drinking Water on Body Weight and Body Measurements of Broiler Chickens. *Animal Science and Biotechnologies*, 47 (2).
- Hu C-H, Ren L-Q, Zhou Y, Ye B-C (2019). Characterization of antimicrobial activity of three *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese traditional dairy food. *Food Science & Nutrition*, 7:1997-2005. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1025>
- Hugo AA, Bruno F, Golowczyc MA (2016). Whey permeate containing galactooligosaccharides as a medium for biomass production and spray drying of *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. *LWT - Food Science and Technology*, 69:185-190.
- Humphrey T, O'Brien S, Madsen M (2007). Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 237–257. 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.006
- Hwang IY, Ku HO, Lim SK, Park CK, Jung G, Jung SC, Nam HM (2009). Species distribution and resistance patterns to growth-promoting antimicrobials of enterococci isolated from pigs and chickens in Korea. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(6):858-62.
- Hyronimus B, Marrec CL, Hadj SA, Deschamps A (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 61:193-197.
- IARC (2012). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 100F:224-248.
- Ibarreche M, Castellano P, Leclercq A, Vignolo G (2016). Control of *Listeria monocytogenes* biofilms on industrial surfaces by the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CRL1862. *FEMS Microbiology letters*, 363(12), fnw118.
- Indira M, Venkateswarulu TC, Vidya Prabhakar K, Abraham Peele K, Krupanidhi S (2018). Isolation and characterization of bacteriocin producing *Enterococcus casseliflavus* and its antagonistic effect on *Pseudomonas aeruginosa*. *Karbala International Journal of Modern Science*, 4(4):361-368.
- Inturri R, Trovato L, Volti GL, Oliveri S, Blandino G (2019). *In vitro* inhibitory activity of *Bifidobacterium longum* BB536 and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 alone or in combination against bacterial and *Candida* reference strains and clinical isolates. *Heliyon*, 5(11): e02891. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02891.
- Izat AL, Tidwell NM, Thomas RA, Reiber MA, Adams MH, Colberg M (1990). Effects of a buffered propionic acid in diets on the performance of broiler chickens and on microflora of the intestine and carcass. *Poultry Science*, 69:818-826.

- Jacobsen CN, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE, Møller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, Sandström B, Tvede M, Jakobsen M (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11):4949-56.
- Jalali M, Abedi D, Varshosaz J, Najjarzadeh M, Mirlohi M, Tavakoli N (2012). Stability evaluation of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. tolerance and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in oral capsules. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 7(1):31-36.
- Jamyuang C, Phoonlapdacha P, Chongviriyaphan N, Chanput W, Nitisinprasert S, Nakphaichit M (2019). Characterization and probiotic properties of Lactobacilli from human breast milk. *Biotechnology*, 9(11). doi:10.1007/s13205-019-1926-y
- Jankowska A, Laubitz D, Antushevich H, Zabielski R, Grzesiuk E (2008). Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2008:357964. doi: 10.1155/2008/357964.
- Jay JM (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, 44: 525-531.
- Jayaraman S, Thangavel G, Kurian H, Mani R, Mukkalil R, Chirakkal H (2013). *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Poultry Science*, 92(2): 370-374.
- Jin LZ, Ho YM, Abdullah N, Jalaldin S (1998). Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken. *Letters in Applied Microbiology*, 27:183-185.
- Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S (2000). Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. *Poultry Science*, 79(6): 886-891.
- Johansen CH, Bjerrum L, Finster K, Pedersen K (2006). Effects of a *Campylobacter jejuni* infection on the development of the intestinal microflora of broiler chickens. *Poultry Science*, 85(4): 579-587.
- Józefiak D, Kaczmarek S, Rutkowski A (2008). A note on the effects of selected prebiotics on the performance and ileal microbiota of broiler chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 17:392-397.
- Kaewnopparat S, Dangmanee N, Kaewnopparat N, Srichana T, Chulasiri M, Settharaksa S (2013). *In vitro* probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Anaerobe* 22:6-13.
- Kakisu E, Abraham AG, Tironi Farinati C, Ibarra C, De Antoni GL (2012). *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir protects vero cells from cytotoxicity by typhell shiga toxin from *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Dairy Research*, 80(1):1-8 DOI: 10.1017/S0022029912000659
- Kandler O, Weiss N (1994). Regular Nonsporing Gram-Positive Rods. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9na Ed. The Williams and Wilkins C. Baltimore; 209-1234.
- Kang MS, Lim HS, Oh JS, Lim Y, Wuertz-Kozak K, Harro JM, Shirliff ME, Achermann Y (2017). Antimicrobial activity of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus*. *Pathogens and Disease*, 75(2). doi:10.1093/femspd/ftx009
- Karimi Torshizi MA, Moghaddam AR, Rahimi Sh, Mojgani N (2010). Assessing the effect of administering probiotics in water or as a feed supplement on broiler performance and immune response. *British Poultry Science*, 51:178-184.
- Kers JG, Velkers FC, Fischer E, Hermes G, Stegeman JA, Smidt H (2018). Host and Environmental Factors Affecting the Intestinal Microbiota in Chickens. *Frontiers in microbiology*, 9, 235. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00235>
- Khan SH & Iqbal J (2016). Recent advances in the role of organic acids in poultry nutrition. *Journal of Applied Animal Research*, 44(1): 359-369. doi: 10.1080/09712119.2015.1079527
- Kihara M & Macnab R (1981). Cytoplasmic pH mediates pH taxis and weak acid repellent taxis of bacteria. *Journal of Bacteriology*, 145:1209-1221.
- Kim JS, Ingale SL, Kim YW, Kim KH, Sen S, Ryu MH, Lohakare JD, Kwon IK, Chae BJ (2011). Effect of supplementation of multi-microbe probiotic product on growth performance, apparent

- digestibility, cecal microbiota and small intestinal morphology of broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96:618-626. doi:10.1111/j.1439-0396.2011.01187.x
- Kim NN, Kim WJ, Kang SS (2019). Anti-biofilm effect of crude bacteriocin derived from *Lactobacillus brevis* DF01 on *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. *Food Control*, 98: 274-280. DOI 10.1016/J.FOODCONT.2018.11.004.
 - Kim Y & Kim SH (2009). Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Biochemical and biophysical research communications*, 379(2): 324-329.
 - Kirtzalidou E, Pramateftaki P, Kotsou M, Kyriacou A (2011). Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. *Anaerobe*, 17: 440e3.
 - Kizerwetter-Świda M & Binek M (2016). Assessment of potentially probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from chickens. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(1):15-20. DOI 10.1515/pjvs-2016-0003
 - Kobierecka PA, Wyszynska AK, Aleksandrak-Piekarczyk T, Kuczkowski M, Tuzimek A, Piotrowska W, Górecki A, Adamska I, Wieliczko A, Bardowski J, Jagusztyn-Krynicka EK (2017). *In vitro* characteristics of *Lactobacillus* spp. strains isolated from the chicken digestive tract and their role in the inhibition of *Campylobacter* colonization. *Microbiology open*, 6(5):e00512. doi: 10.1002/mbo3.512.
 - Kociubinski G, Perez P, De Antoni G (1999). Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Food Protection*, 62:905-912.
 - Kogut MH & Arsenault RJ (2016) "Editorial: Gut Health: The New Paradigm in Food Animal Production", *Frontiers in Veterinary Science*. *Frontiers in Veterinary Science*, 3:1-4. doi: 10.3389/fvets.2016.00071.
 - Kogut MH & Oakley BB (2016). Spatial and temporal changes in the broiler chicken cecal and fecal microbiomes and correlations of bacterial taxa with cytokine gene expression. *Frontiers in Veterinary Science*, 3:11. doi: 10.3389/fvets.2016. 00011
 - Koohestani M, Moradi M, Tajik H, Badali A (2018). Effects of cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Lactobacillus casei* 431 against planktonic form and biofilm of *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Research Forum*, 9(4):301-306. doi: 10.30466/vrf.2018.33086
 - Kos B, Šušković J, Vuković S, Šimpraga M, Frece J, Matošić S (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 981-987. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x
 - Krebs HA, Wiggins D, Stubbs M, Sols A, Bedoya F (1983). Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *The Biochemical Journal. Portland Press Ltd*, 214(3): 657-63.
 - Kulozik U & Wilde J (1999). Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(5-6):297-302. doi:10.1016/s0141-0229(98)00122-7
 - Kum S, Eren U, Onol A, Sandikci M (2010). Effects of dietary organic acid supplementation on the intestinal mucosa in broilers. *Revista de Medicina Veterinaria*, 10:463-468.
 - Kumar M, Shweta Jaiswal, Kushneet Kaur Sodhi, Pallee Shree, Dileep Kumar Singh, Pawan Kumar Agrawal, Pratyosh Shukla (2019). Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance. *Environment International*, 124: 448-461.
 - Kurtoglu V, Kurtoglu F, Seker E, Coskun B, Balevi T, Polat ES (2004). Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol. *Food Additives & Contaminants*, 21(9): 817-823. doi: 10.1080/02652030310001639530
 - Kurzak P, Ehrmann MA, Vogel R (1998). Diversity of lactic acid bacteria associated with ducks. *Systematic Applied Microbiology* 21, 588-592.
 - Kwiatkowski M, Engelstädter J, Vorburger C (2012). On genetic specificity in symbiont-mediated host-parasite coevolution. *PLoS Computational Biology*, 8, e1002633.

- Kwon HA, Kwon YJ, Kwon DY, Lee JH (2008). Evaluation of antibacterial effects of a combination of Coptidis Rhizoma, Mume Fructus, and Schizandrae Fructus against *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, 127 (1–2): 180-183.
- La Ragione RM, Narbad A, Gasson MJ, Woodward MJ (2004). *In vivo* characterization of *Lactobacillus johnsonii* F19785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. *Letters in Applied Microbiology*, 38:197-205.
- Lan PTN, Binh LT, Benno Y (2003). Impact of two probiotic *Lactobacillus* strains feeding on fecal lactobacilli and weight gains in chicken. *Journal of General and Applied Microbiology*, 49(1): 29-36.
- Lan Y, Verstegen MWA, Tamminga S, Williams BA (2005). The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. *World's Poultry Science Journal*, 61:95-104. DOI: 10.1079/WPS200445
- Lara LJ & Rostagno MH (2013). Impact of heat stress on poultry production. *Animals*, 3: 356-369.
- Latorre JD, Hernandez-Velasco X, Bielke LR, Vicente JL, Wolfenden R, Menconi A, Hargis BM, Tellez G (2015). Evaluation of a *Bacillus* direct-fed microbial candidate on digesta viscosity, bacterial translocation, microbiota composition and bone mineralisation in broiler chickens fed on a rye-based diet. *British Poultry Science*, DOI:10.1080/00071668.2015.1101053
- Lavari L, Ianniello R, Páez R, Zotta T, Cuatrin A, Reinheimer J, Parente E, Vinderola G (2015). Growth of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in whey permeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1):322-330. doi:10.1016/j.lwt.2015.03.066.
- Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A, Gobbetti M (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9): 4084-4090.
- Lee DN, Lyu SR, Wang RC, Weng CF, Chen BJ (2011). Exhibit differential functions of various antibiotic growth promoters in broiler growth, immune response and gastrointestinal physiology. *International Journal of Poultry Science*, 10:216-220 10.3923/ijps.2011.216.220
- Lee YK & Salminen S (1995). The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 6:241-245.
- Lee Y-K, Puong K-Y, Ouwehand AC, Salminen S (2003). Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of Medical Microbiology*, 52:925-930.
- Lehto EM & Salminen SJ (1997). Inhibition of *Salmonella typhimurium* adhesion to Caco-2 cell cultures by *Lactobacillus* strain GG spent culture supernate: only a pH effect? *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 18(2): 125-132.
- León Peláez AM (2013). Trabajo de Tesis Doctoral “Estudio de la capacidad de los microorganismos del kefir para inhibir el desarrollo fúngico y para secuestrar micotoxinas” Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/32500> (último acceso: 8/4/2020).
- León Peláez AM, Montoya O, Motato KE, Granda DM, Caro CA, Restrepo JM, Echeverri S, Valencia J, Quinchia L (2006). Bacterias ácido lácticas (BAL) silvestres colombianas presentan propiedades adecuadas para la fabricación de masa ácida. *Vitae*, 13(2): 26-35.
- León Peláez AM, Serna Cataño CA, Quintero Yepes, EA., Gamba Villarroel RR, De Antoni GL, Giannuzzi L (2012) Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. *Food Control*, 24(1–2): 177-183.
- Leone E, Alves de Souza P, Alves de Souza H, Oba A, Norkus E, Kodawara L, Azevedo de Lima T (2003). Morfometría e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. *RPCV.*, 98: 125-134
- Leyva Salas M, Mounier J, Valence-Bertel F, Coton M, Thierry A, Coton E (2017). Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation-A Review. *Microorganisms*, doi: 10.3390/microorganisms5030037.

- Li HL, Zhao PY, Lei Y, Hossain MM, Kim IH (2015). Phytoncide, phytogetic feed additive as an alternative to conventional antibiotics, improved growth performance and decreased excreta gas emission without adverse effect on meat quality in broiler chickens. *Livestock Science*, 181:1–6.
- Liang MJ, Wang ZP, Xu L, Leng L, Wang SZ, Luan P, Li H (2015). Estimating the genetic parameters for liver fat traits in broiler lines divergently selected for abdominal fat. *Genetics & Molecular Research*, 14: 9646-9654.
- Lin TH & Pan TM (2017). Characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus plantarum* NTU 102. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. doi:10.1016/j.jmii.2017.08.003
- Lin WH, Yu B, Jang SH, Tsen HY (2007). Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*, 13:107-113.
- Line JE, Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Levchuk VP, Svetoch OE, Seal BS, Siragusa GR, Stern NJ (2008). Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 1094-1100.
- Lombardi AM, Bevilacqua AE, Califano AN (1994). Variation in organic acids content during ripening of Reggiano cheese in air-tight sealed bags. *Food Chemistry*, 51: 221-226.
- Londero A (2012). Trabajo de Tesis Doctoral: “Alimentos funcionales: obtención de un producto probiótico para aves a partir de suero de quesería fermentado con microorganismos de kefir” Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2776> (último acceso :7/4/2020).
- Londero A, Iraporda C, Garrote GL; Abraham AG (2015). Cheese whey fermented with kefir micro-organisms: antagonism against *Salmonella* and immunomodulatory capacity. *International Journal Of Dairy Technology*, 68 (1): 118–126.
- Lopes PD, Freitas Neto OC, Batista DFA, Denadai J, Alarcon MFF, Almeida AM, Vasconcelos RO, Setta A, Barrow PA, Berchieri A (2016). Experimental infection of chickens by a flagellated motile strain of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum. *The Veterinary Journal*, 214: 40-46. doi:10.1016/j.tvjl.2016.05.006
- Lopez-Giacoman S & Madero M (2015). Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage. *World Journal of Nephrology*, 4(1): 57-73.
- Lovelock JE (1954). The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochemical Journal*, 56: 265-270.
- Lu J, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JJ, Lee MD (2003). Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11): 6816-6824. doi: 10.1128/AEM.69.11.6816-6824.2003
- Lu L & Walker WA (2001). Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 1124-1130.
- Lukjancenko O, Ussery DW, Wassenaar TM (2012). Comparative genomics of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related probiotic genera. *Microbial Ecology*, 63: 651-673.
- Lutful Kabir SM (2009). The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(8), 3531–3546. <https://doi.org/10.3390/ijms10083531>
- Lutful Kabir SM, Rahman MM, Bahanur Rahman MD, Ahmed SU (2004). The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. *International Journal of Poultry Science*. 3: 361-364. DOI: 10.3923/ijps.2004.361.364.
- Lye HS, Rusul G, Liong MT (2010). Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *Journal of Dairy Science*, 93(4): 1383-1392.
- Mabona U, Viljoen A, Shikanga E, Marston A, van Vuuren S (2013). Antimicrobial activity of southern african medicinal plants with dermatological relevance: from an ethnopharmacological screening approach, to combination studies and the isolation of a bioactive compound. *Journal of Ethnopharmacology*, 148:45-55.

- Mac Faddin JF (1980). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (ed) Medica Panamericana, Buenos Aires.
- Macari M, Furlan R, Gonzalez E (1994). Fisiología aviaria aplicada a frangos de corte. FUnep/Unesp.296pp
- Maciel MJ, Machado G, Avancini CA (2019). Investigation of resistance of *Salmonella* spp. isolated from products and raw material of animal origin (swine and poultry) to antibiotics and disinfectants. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 20, e0162019..<https://dx.doi.org/10.1590/s1519-9940200162019>
- Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291:203-210.
- Madureira AR, Pereira CI, Truszkowska K, Gomes AM, PintadoME, Malcata FX (2005). Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 15:921-927.
- Malaipuang R (2001). Master of Science Degree Thesis: "Production of probiotic for chicken feed from Thai isolated lactic acid bacteria". Kasetsart University. Bangkok, Thailandia.
- Malamud M (2019). Trabajo de Tesis Doctoral: "Proteínas superficiales de bacterias lácticas con potencialidad biotecnológica: estudios estructurales y funcionales de las proteínas de capa S de *Lactobacillus kefir*" Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/77909> (último acceso :7/4/2020)
- Maldonado Galdeano C, de Moreno de LeBlanc A, Vinderola G, Bibas Bonet ME, Perdigon G (2007). Proposed Model: Mechanisms of Immunomodulation Induced by Probiotic Bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14:485-492.
- Manca de Nadra MC (2007). Nitrogen metabolism in lactic acid bacteria from fruits: A review. In Méndez-Vilas (Ed.), *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology* (p. 500-510). Badajoz: Formatex Reseach Center
- Mani-López E, García HS, López-Malo A (2012). Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*, 45(2):713-721. doi:10.1016/j.foodres.2011.04.043
- Mantilla SPS, Santos EB, de Freitas MQ, d-e Carvalho Vital H, Mano SB, Franco RM (2012). Refrigerated poultry breast fillets packed in modified atmosphere and irradiated: bacteriological evaluation, shelf life and sensory acceptance. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43:1385-1392.
- Mañes-Lázaro R, Van Diemen PM, Pin C, Mayer MJ, Stevens MP, Narbad A (2017). Administration of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 to chickens affects colonisation by *Campylobacter jejuni* and the intestinal microbiota, *British Poultry Science*, 58(4):373-381, DOI: 10.1080/00071668.2017.1307322
- Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris GH, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou B (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16: 189-199.
- Marianelli C, Cifani N, Pasquali P (2010). Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions. *Research in Microbiology*, 161(8): 673-680.
- Markowiak P & Śliżewska K (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*, 10:21.
- Marschall J, Bhavan KP, Olsen MA, Fraser VJ, Wright NM, Warren DK (2011). The Impact of Prebiopsy Antibiotics on Pathogen Recovery in Hematogenous Vertebral Osteomyelitis. *Clinical Infectious Diseases*, 52(7): 867-872.
- Marteau P (2002). Probiotics in clinical conditions. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 22:255-273.

- Martoja R & Martoja-Pierson M (1970). Técnicas de Histología Animal. 1a ed. Editado por M. Estartús Moncanut y M. Dufort Coll. Barcelona, Spain: Toray-Mason.
- Maxwell M & Robertson G (1998). UK survey of broiler ascites and sudden death syndromes in 1993. *British Poultry Science*, 39: 203-215.
- May J & Lott B (2001). Relating weight gain and feed: Gain of male and female broilers to rearing temperature. *Poultry Science*, 80: 581-584.
- Mazur P (2004). Principles of cryobiology in. Life in the Frozen State (Fuller B.J. Lane N.J. EE Benson, eds), pp. 3–65. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Mead GC (1997). Bacteria in the gastrointestinal tract of birds, p.216–240. In R. I. Mackie, B. A. White, and R. E. Isaacson (ed.), *Gastrointestinal microbiology*, vol. 2. Chapman & Hall, New York, N.Y.
- Mehdi Y, Létourneau-Montminy MP, Gaucher ML, Chorfi Y, Suresh G, Rouissi T, Brar SK, Côté C, Ramirez AA, Godbout S (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition*, 4(2):170-178. doi: 10.1016/j.aninu.2018.03.002.
- Mercan E, İspirli H, Sert D, Yılmaz MT, Dertli E (2015). Impact of exopolysaccharide production on functional properties of some *Lactobacillus salivarius* strains. *Archives of Microbiology*, 197(9): 1041–1049. Doi:10.1007/s00203-015-1141-0
- Merino L (2019). Trabajo de Tesis Doctoral “Empleo de bacterias lácticas y sus metabolitos como estrategia de biocontrol para disminuir la incidencia de cepas de *Salmonella* spp. formadoras de biopelículas en granjas avícolas” Facultad de Ciencias Exactas-UNLP, Argentina. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/85495> (último acceso: 7/4/2020).
- Merino L, Procura F, Trejo FM, Bueno DJ, Golowczyc MA (2019). Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. *Food Research International*, 119: 530-540.
- Merino L, Trejo F, De Antoni G, Golowczyc M (2016). Estudio de la acción de *Lactobacillus kefir* cepa CIDCA 8321 en la formación de biopelículas de cepas de *Salmonella*. Congreso Latinoamericano y Argentino de Microbiología. 26-30 de septiembre, Rosario, Argentina.
- Merino L, Trejo FM, De Antoni G, Golowczyc MA (2019). *Lactobacillus* strains inhibit biofilm formation of *Salmonella* sp. isolates from poultry. *Food Research International*, 123: 258-265.
- Merritt ME & Doaldson JR (2009). Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *Journal of Medical Microbiology*, 58:1533-1541.
- Messaoudi S, Madi A, Prévost H, Feuilloley M, Manai M, Dousset X, Connil N (2012). *In vitro* evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Anaerobe*, 18:584-589.
- Messaoudi S, Manai M, Kergourlay G, Prévost H, Connil N, Chobert JM, Dousset X (2013). *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology*. 36: 296-304.
- Methner U, Barrow PA, Martin G, Meyer H (1997). Comparative study of the protective effect against *Salmonella* colonization in newly hatched SPF chickens using live attenuated *Salmonella* vaccine strains, wild-type *Salmonella* strains or a competitive exclusion product. *International Journal of Food Microbiology*, 35: 223-230.
- Meunier V, Bourré M, Berger Y, Fabre G (1995). The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biology and Toxicology*, 11:187-194.
- Miles RD, Butcher GD, Henry PR, Littell RC (2006). Effect of Antibiotic Growth Promoters on Broiler Performance, Intestinal Growth Parameters, and Quantitative Morphology. *Poultry Science*, 85: 476-485.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (2019). <https://datos.magyp.gob.ar/dataset?q=carne&tags=aves> (último acceso: 8/4/2020).
- Ministerio de Economía (2019). Visualización de datos productivos. <https://www.minhacienda.gob.ar/datos/visualizacion-de-datos-productivos/carne/> (último acceso: 8/4/2020).

- Mohammadagheri N, Najafi R, Najafi G (2016). Effects of dietary supplementation of organic acids and phytase on performance and intestinal histomorphology of broilers. *Veterinary Research Forum*, 7:189-195.
- Molfese I (2019). Manejo de pollo bebe, las tres primeras semanas de vida. <http://las-plumas-ala.com/2019/04/05/manejo-de-pollo-bebe-las-tres-primeras-semanas-de-vida/> (último acceso: 8/4/2020).
- Molnár AK, Podmaniczky B, Kürti P, Tenk I, Glávits R, Virág GY, Szabó, ZS (2011). Effect of different concentrations of *Bacillus subtilis* on growth performance, carcass quality, gut microflora and immune response of broiler chickens. *British Poultry Science*, 52:658-665.
- Monteagudo-Mera A, Rastall RA, Gibson GR, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103:6463-6472. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09978-7>
- Morales OE & W Boclair (1993). Morphometric relations bursa/ spleen in infectious bursal disease. Proc. 42nd Western Poultry Disease Conference, Sacramento, California pp. 9.
- Morales-Lopez R, Auclair E, Garcia F, Esteve-Garcia E, Brufau J (2009). Use of yeast cell walls; Beta-1, 3/1, 6-glucans; and mannoproteins in broiler chicken diets. *Poultry Science*, 88:601-607.
- Moretti AF, Gamba RR, Puppo J, Malo N, Gómez-Zavaglia A, Pelaez AL, Golowczyc MA (2018). Incorporation of *Lactobacillus plantarum* and zeolites in poultry feed can reduce aflatoxin B1 levels. *Journal of Food Science and Technology*, 55: 431-436. doi: 10.1007/s13197-017-2923-y.
- Mountzouris KC, Paraskevas V, Tsirtsikos P, Palamidi I, Steiner T, Schatzmayr G (2011). Assessment of a phytogenic feed additive effect on broiler growth performance, nutrient digestibility and caecal microflora composition. *Animal Feed Science and Technology*, 168:223-231.
- Mountzouris KC, Tsirtsikos P, Kalamara E, Nitsch S, Schatzmayr G, Fegeros K (2007). Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating caecal microflora composition and metabolic activities. *Poultry Science*, 86(2): 309-17.
- Mountzouris KC, Tsirtsikos P, Palamidi I, Arvaniti A, Mohnl M, Schatzmayr G, Fegeros K (2010). Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. *Poultry Science*, 89(1): 58-67. doi: 10.3382/ps.2009-00308.
- Murima P, McKinney JD, Pethe K (2014). Targeting Bacterial Central Metabolism for Drug Development. *Chemistry & Biology* 123. *Cell Press*, 21(11): 1423-1432.
- Murry AC, Hinton A, Morrison H (2004). Inhibition of growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridium perfringens* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Poultry Science*, 3: 603 - 607.
- Murugesan GR, Syed B, Haldar S, Pender C (2015). Phytogenic Feed Additives as an Alternative to Antibiotic Growth Promoters in Broiler Chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, 2: 21. DOI=10.3389/fvets.2015.00021
- Musikasang H, Tani A, H-kittikun A, Maneerat S (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25:1337-1345.
- Muyneck C, Leroy A, De Maeseneire SL, Arnaut F, Soetaert W, Vandamme E (2004). Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological research*, 159:339-46. 10.1016/j.micres.2004.07.002.
- Muyzer G, De Waal E, Uiterlinden A (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:695-700.
- Naeem M, Naeem T, Ali Z (2018). Importance and Promotion of Gut Health in Broilers through Dietary Interventions. *Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences*, 3(1). DOI: 10.31031/APDV.2018.03.000552

- Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38:13-126.
- Nakphaichit M, Sobanbua S, Siemuang S, Vongsangnak W, Nakayama J, Nitisinprasert S (2018). Protective effect of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 against *Salmonella* Enteritidis challenge in chickens. *Beneficial Microbes*, 10(1):43-54. doi:10.3920/bm2018.0034
- Nallala V & Jeevaratnam K (2018). Probiotic Evaluation of Antimicrobial *Lactobacillus plantarum* VJC38 Isolated from the Crop of Broiler Chicken. *Microbiology*, 87(3):350-362. doi:10.1134/s0026261718030062
- Nantavisai K, Puttikamonkul S, Chotelersak K, Taweechotipatr M (2018). *In vitro* adhesion property and competition against enteropathogens of *Lactobacillus* strains isolated from Thai infants. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 40(1): 69-74. DOI: 10.14456/sjst-psu.2018.14
- Nava GM, Attene-Ramos MS, Gaskins HR, Richards JD (2009). Molecular analysis of microbial community structure in the chicken ileum following organic acid supplementation. *Veterinary Microbiology*, 137:345-353
- Neal-McKinney JM, Lu X, Duong T, Larson CL, Call DR, Shah DH, Konkel ME (2012). Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. *PLoS One*, 7(9):e43928. doi: 10.1371/journal.pone.0043928.
- Neeser JR, Granato D, Rouvet M, Servin A, Teneberg S, Karlsson KA (2000). *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology*, 10(11): 1193-1199.
- Nepomuceno ES & Andreatti RLF (2000). Probióticos e prebióticos na avicultura. *Simpósio de Sanidade Avícola*, 2:45-55.
- Netherwood TH, Gilbert J, Parker DS, O'Donnell AG (1999). Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:5134-5138.
- Nishiyama K, Seto Y, Yoshioka K, Kakuda T, Takai S, Yamamoto Y, Mukai T (2014). *Lactobacillus gasseri* SBT2055 Reduces Infection by and Colonization of *Campylobacter jejuni* *PLoS One*, 9(9): e108827. doi: 10.1371/journal.pone.0108827
- Noohi N, Ebrahimipour G, Rohani M, Talebi M, Pourshafie MR (2014). Phenotypic characteristics and probiotic potentials of *Lactobacillus* spp. isolated from poultry. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(9):e17824. *Research*, 15:726-733.
- Noordhout CM, Devleeschauwer B, Angulo FJ, Verbeke G, Haagsma J, Kirk M, Havelaar A, Speybroeck N (2014). The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(11):1073-1082.
- Noy Y & Sklan D (1995). Digestion and Absorption in the Young Chick. *Poultry Science*, 74(2):366-73.
- Nurmi E & Rantala M (1973). New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature*, 241(5386):210-1.
- Oakley BB, Lillehoj HS, Kogut MH, Kim WK, Maurer JJ, Pedroso A, Lee MD, Collett SR, Johnson TJ, Cox NA (2014). The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiology Letters*, 360:100-112.
- Oláh I, Nagy N, Vervelde L (2013). Structure of the avian lymphoid system., *Avian Immunology: Second Edition*, pp. 11–44.
- Olivares M, Díaz-Roperó M, Martín R, Rodríguez J, Xaus J (2006). Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 72-79. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02981.x
- Oliveira DCV, Fernandes Júnior A, Kaneno R, Silva MG, Araújo Júnior JP, Silva NCC, Mores Rall VL (2014). Ability of *Salmonella* sp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. *Foodborne Pathogens and Disease*, 1(1): 1-7.

- Olnood CG, Beski SSM, Choct M, Iji PA (2015). Use of *Lactobacillus johnsonii* in broilers challenged with *Salmonella sofia*. *Animal Nutrition*, 3:203–212. doi:10.1016/j.aninu.2015.07.001
- Olnood CG, Beski SSM, Iji P, Choct M (2015). Delivery routes for probiotics: Effects on bird performance, intestinal morphology and gut microflora. *Animal Nutrition*, 1: 192–202.
- Orji MU, Onuigbo HC, Mbata TI (2005). Isolation of *Salmonella* from poultry droppings and other environmental sources in Awka, Nigeria. *International Journal of Infectious Diseases*, 9 (2): 86-89. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2004.04.016>.
- Ouwehand AC & Vesterlund S (2003). Health aspects of probiotics. *IDrugs*, 6(6): 573–580.
- Ouwehand AC & Vesterlund S (2004). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects*, 3rd Edn eds Salminen, S., Ouwehand, A. and von Wright, A. pp. 375–395. New York.: Marcel Dekker.
- Pan D & Yu Z (2014). Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*, 5(1): 108-19. doi: 10.4161/gmic.26945.
- Pantoja-Estrada D (2014). Manejo de temperatura ambiental y calidad de aire, su influencia en líneas de pollo de engorde: Una revisión. Sitio web de Engormix. <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/manejo-temperatura-ambiental-calidad-t31776.htm> (último acceso: 8/4/2020).
- Park SH, Lee SI, Ricke SC (2016). Microbial populations in naked neck chicken ceca raised on pasture flock fed with commercial yeast cell wall prebiotics via an illumina miseq platform. *PLoS One.*, 11.
- Pascual M, Garriga M, Monfort JM (1996). Los probióticos en la alimentación animal. *Eurocarne*, 44: 91-96.
- Patel HM, Pandiella SS, Wang RH, Webb C (2004). Influence of malt, wheat and barley extracts on the bile tolerance of selected strains of lactobacilli. *Food Microbiology*, 21: 83-89
- Patterson JA & Burkholder KM (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, 82:627–631. DOI: 10.1093/ps/82.4.627.
- Pedroso AA, Hurley-Bacon AL, Zedek AS, Kwan TW, Jordan APO, Avellaneda G, Hofacre CL, Oakley BB, Collett SR, Maurer JJ, Lee MD (2013). Can Probiotics Improve the Environmental Microbiome and Resistome of Commercial Poultry Production?. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(10): 4534–4559. doi: 10.3390/ijerph10104534
- Pérez-Ibarreche M, Castellano P, Leclercq A, Vignolo G (2016). Control of *Listeria monocytogenes* biofilms on industrial surfaces by the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CRL1862. *FEMS Microbiology Letters*, 363(12). pii: fnw118. doi: 10.1093/femsle/fnw118.
- Perić L, Žikić D, Lukić M (2009). Application of alternative growth promoters in broiler production. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5-6):387-397.
- Pessoa WFB, Melgaço ACC, de Almeida ME, Ramos LP, Rezende RP, Romano CC (2017). In Vitro Activity of Lactobacilli with Probiotic Potential Isolated from Cocoa Fermentation against *Gardnerella vaginalis*. *BioMed Research International*, 2017:3264194. doi: 10.1155/2017/3264194.
- Petrova MI, Imholz NCE, Verhoeven TLA, Balzarini J, Van Damme EJM, Schols D, Vanderleyden J, Lebeer S (2016). Lectin-like molecules of *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibit pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* biofilm formation. *PLOS ONE* 11(8):e0161337 DOI 10.1371/journal.pone.0161337.
- Pew Charitable Trusts Antibiotics and Innovation Project (2013). A new pathway for antibiotic innovation: exploring drug development for limited populations. The Pew Charitable Trusts, Philadelphia, PA. <http://www.pewhealth.org/other-resource/a-new-pathway-for-antibiotic-innovation-exploring-drug-development-for-limited-populations-85899450008> (último acceso: 8/4/2020).
- Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53:28–52.

- Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A (1983). Enterocyte-like Differentiation and Polarization of the Human Colon Carcinoma Cell Line Caco-2 in Culture. *Journal of Cell Biology*, 47:323-330.
- Pissula A (2018). Tesis de maestría "Detecting a Probiotic Product Within the Gut of Broiler Chickens". Universidad Politécnica Estatal de California. San Luis Obispo, Estados Unidos. <https://digitalcommons.calpoly.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=3283&context=theses> (último acceso: 8/4/2020).
- Platel K & Srinivasan K (2004). Digestive stimulant action of spices: a myth or reality? *Indian Journal of Medical Research*, 119:167-179.
- Pluske JR, Turpin DL, Kim JC (2018). Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. *Animal Nutrition*, 4(2): 187-196. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.12.004>.
- Pokorná A, Maňáková T, Čížek A (2019). Properties of potentially probiotic *Lactobacillus* isolates from poultry intestines. *Acta Veterinaria Brunensis*, 88: 73-84; <https://doi.org/10.2754/avb20198801073>.
- Pomeroy BS, Nagaraja KV, Fowl Typhoid, En: Diseases of poultry, (Ed.: Calnek, B.W.), 9º ed, Wolfe Publishing Ltd., USA, 1991.
- Poppi LB, Rivaldi JD, Coutinho TS, Astolfi-Ferreira CS, Ferreira AJ, Mancilha IM (2015). Effect of *Lactobacillus* sp. isolates supernatant on *Escherichia coli* O157:H7 enhances the role of organic acids production as a factor for pathogen control. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(4): 353-359. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2015000400007>
- Potočnjak M, Pušić P, Frece J, Abram M, Janković T, Gobin I (2017). New Probiotic *L. plantarum* Strains against *S. Typhimurium*. *Food Technology and Biotechnology*. 55 (1): 48-54.
- Prasad J, Gill H, Smart J, Gopal PK (1998). Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotic. *International Dairy Journal*, 8: 993-1002.
- Prazeres AR, Carvalho F, Rivas J (2012). Cheese whey management: a review. *Journal of environmental management*, 110:48-68. doi: 10.1016/j.jenvman.2012.05.018
- Pridmore RD, Pittet AC, Praplan F, Cavadini C (2008). Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-*Salmonella* activity. *FEMS Microbiology Letters*, 283(2): 210-215. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01176.x
- Proctor H & Owens I (2000). Mites and birds: diversity, parasitism and coevolution. *Trends in ecology & evolution*, 15(9):358-364.
- Pulido-Landínez (2017). *Salmonella* Gallinarum en Latinoamérica: casos de campo y nuevas tendencias en estrategias de control. Sitio ENGORMIX. <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/salmonella-gallinarum-latino-america-t41536.htm> (último acceso: 8/4/2020).
- Rajoka MShR, Hayat HF, Sarwar S, Mehwish HM, Ahmad F, Hussain N, Shah SZH, Khurshid M, Siddiqu M, Shi J (2018). Isolation and Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Poultry Intestine. *Microbiology*, 87(1): 116-126.
- Ranjitkar S, Lawley B, Tannock G, Engberg RM (2016). Bacterial Succession in the Broiler Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(8):2399-2410. doi: 10.1128/AEM.02549-15.
- Ravindran V, Tanchaorenrat P, Zaefarian F, Ravindran G (2016). Fats in poultry nutrition: Digestive physiology and factors influencing their utilization. *Animal Feed Science and Technology*, 213:1-21.
- Reece F & Lott B (1982). The effect of environmental temperature on sensible and latent heat production of broiler chickens. *Poultry Science*, 61: 1590-1593.
- Rehman HU, Vahjen W, Awad WA, Zentek J (2007). Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Archives of Animal Nutrition*, 61:319-35. doi: 10.1080/17450390701556817

- Ren H, Zentek J, Vahjen W (2019). Optimization of Production Parameters for Probiotic *Lactobacillus* Strains as Feed Additive. *Molecules*, 24(18):3286. doi: 10.3390/molecules24183286.
- Requena T & Peláez C (1995). Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 35: 19 - 44.
- Ribet D & Cossart P (2015). How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes and Infection*, 17(3): 173-183. doi:10.1016/j.micinf.2015.01.004
- Ricke S (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*, 82(4): 632-639. doi:10.1093/ps/82.4.632
- Rinttila T & Apajalahti J (2003). Intestinal microbiota and metabolites-implications for broiler chicken health and performance. *Journal of Applied Poultry Research*, 22(3):647-658. doi: 10.3382/japr.2013-00742.
- Rocha e Silva RC, Cardoso WM, Teixeira RSC, Horn RV, Cavalcanti CM, Almeida CP, Sampaio FP, Albuquerque AH, Lopes ES, Gomes Filho VJR, Bezerra WGA, Vasconcelos Filho FSL, Freitas ML (2015). Recovery of *Salmonella* Gallinarum in the Organs of Experimentally-Inoculated Japanese Quails (*Coturnix coturnix*). *Brazilian Journal of Poultry Science*, 17(3): 281-286. <https://doi.org/10.1590/1516-635X1703281-286>
- Rodríguez-González SP & Moreno-Figueredo G (2015). Evaluación del efecto de *Lactobacillus* spp. en el desarrollo del intestino delgado en pollos de engorde. *Revista Ciencia y Agricultura*, 13 (1): 49-58.
- Roissart H & Luquet FM (1994). Bactéries Lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques (Vol. 2). Grenoble, France: Loriga. In: Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt, (eds.).
- Roldán ML, Otero JL, Villarreal F, Baroni MR, Carrasco MS, Álvarez C, Russell-White K, Méndez, E, Simonetta AC (2011). Efecto inhibitorio de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31(1): 37-41.
- Rondón AJ, Samaniego LM, Bocourt R, Rodríguez S, Milián G, Ranilla MJ, Laurencio M, Pérez M (2008). Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6:1, 56-63, DOI: 10.1080/11358120809487628
- Rose N, Beaudeau F, Drouin P, Toux JY, Rose V, Colin P (200). Risk factors for *Salmonella* persistence after cleansing and disinfection in French broiler-chicken houses. *Preventive Veterinary Medicine*, 44 (1-2): 9-20.
- Rosmini MR, Sequeira G, Guerrero Legarreta I, Martí L, Dalla Santina R, Frizzo L, Bonazza JC (2004). Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 3:187-197.
- Rousset M (1986). The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2; two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie*, 68(9):1035-40. DOI: 10.1016/s0300-9084(86)80177-8
- Rowland IR, Capurso L, Collins K, Cummings J, Delzenne N, Goulet O, Guarner F, Marteau P, Meier R (2010). Current level of consensus on probiotic science—report of an expert meeting—London, 23 November 2009. *Gut Microbes*, 1(6): 436. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.6.13610>
- Rubin HE (1978). Toxicological model for a two-acid system. *Applied and Environmental Microbiology*, 36: 623-624.
- Russo P, Arena MP, Fiocco D, Capozzi V, Drider D, Spano G (2017). *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *International Journal of Food Microbiology*, 247:48-54.
- Salarmoini M & Fooladi MH (2010). Efficacy of *Lactobacillus acidophilus* as probiotic to improve broiler chicks performance. *Journal of Agricultural Science & Technology*, 13:165-172.

- Salehimanesh A, Mohammadi M, Roostaei-Ali Mehr M (2016). Effect of dietary probiotic, prebiotic and synbiotic supplementation on performance, immune responses, intestinal morphology and bacterial populations in broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(4):694-700. doi:10.1111/jpn.12431
- Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *The British Journal of Nutrition*, 80:S147-S171.
- Salmond CV, Kroll RG, Booth IR (1984). The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 130:2845-2850.
- Salomon HM, Zegeye N, Tariku T, Andargie E, Endalafer N, Aseffa A (2014). Potential of cell-free supernatants from cultures of selected lactic acid bacteria and yeast obtained from local fermented foods as inhibitors of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*. *BMC Research Notes*, 7: 606.
- Samanya M & Yamauchi K (2002). Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. Natto. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133: 95-104.
- Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, 21:1-26.
- Samli HE, Senkoğlu N, Koc F, Kanter M, Ağma A (2007). Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and microbiota. *Archives of Animal Nutrition*, 61: 42-49.
- Santos A, San Mauro M, Sanchez A, Torres JM, Marquina D (2003). The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 26:434-437.
- Schiffrin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A (1995). Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 78:491-497.
- SENASA - SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA (2015). <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-594-2015-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria> (último acceso: 8/4/2020).
- SENASA- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. RESOLUCIÓN-106-2013. <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-106-2013-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria> (último acceso: 8/4/2020).
- Sergeant MJ, Constantinidou C, Cogan TA, Bedford MR, Penn CW, Pallen MJ (2014). Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. *PLoS ONE* 9:e91941. 10.1371/journal.pone.0091941
- Servin AL (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens," *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4): 405-440.
- Shahir MH, Afsarian O, Ghasemi S, Tellez G (2014). Effects of dietary inclusion of probiotic on growth performance, organ weight, blood parameters and antibody titers against Influenza and Newcastle in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 13:70-75.
- Shang K, Wei B, Kang M (2018). Distribution and dissemination of antimicrobial-resistant *Salmonella* in broiler farms with or without enrofloxacin use. *BMC Veterinary Research*, 14: 257. doi:10.1186/s12917-018-1590-1
- Shang Y, Kumar S, Oakley B, Kim WK (2018) Chicken Gut Microbiota: Importance and Detection Technology. *Frontiers in Veterinary Science*, 5:254. doi: 10.3389/fvets.2018.00254
- Sharma C, Singh BP, Thakur N, Gulati S, Gupta S, Mishra SK, Panwar H (2017). Antibacterial effects of *Lactobacillus* isolates of curd and human milk origin against food-borne and human pathogens. *3 Biotech*, 7(1): 31.
- Sheu CW, Salomon D, Simmons JL, Sreevalsan T, Freese E (1975). Inhibitory Effects of Lipophilic Acids and Related Compounds on Bacteria and Mammalian Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7 (3): 349-363; DOI: 10.1128/AAC.7.3.349

- Shinder D, Rusal M, Tanny J, Druyan S, Yahav S (2007). Thermoregulatory responses of chicks (*Gallus domesticus*) to low ambient temperatures at an early age. *Poultry Science*, 86: 2200-2209.
- Shivaprasad HL (2000) Fowl typhoid and pullorum disease. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics), 19(2):405-24.
- Shokryazdan P, Faseleh Jahromi M, Liang JB, Ramasamy K, Sieo CC, Ho YW (2017). Effects of a *Lactobacillus salivarius* mixture on performance, intestinal health and serum lipids of broiler chickens. *PLOS ONE* 12(5): e0175959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175959> study of intestinal differentiation. *Biochimie*, 68(9):1935-1940.
- Siegumfeldt H, BjörnRechinger K, Jakobsen M (2000). Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6): 2330-2335.
- Silva A & Nass I (2004). Equipamentos para aquecimento e refrigeração. Produção de frangos de corte. *Facta*. 5: 85-96
- Simaraks S, Chinrasri O, Aengwanich W (2004). Hematological, electrolyte and serum biochemical values of the Thai indigenous chickens (*Gallus domesticus*) in northeastern, Thailand. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(3): 425-430.
- Singer SJ, Gaba DM, Geppert JJ, Sinaiko AD, Howard SK, Park KC (2003). The Culture of Safety in California Hospitals. *Quality and Safety in Health Care*, 12(2):112-8.
- Singh N, Sharma C, Gulhane RD, Rokana N, Singh BP, Puniya AK, Panwar H (2018). Inhibitory effects of lactobacilli of goat's milk origin against growth and biofilm formation by pathogens: An *in vitro* study. *Food Bioscience*, 22: 129-138.
- Singh P, Karimi A, Devendra K, Waldroup PW, Cho KK, Kwon YM (2013). Influence of penicillin on microbial diversity of the cecal microbiota in broiler chickens. *Poultry Science*, 92: 272-276.
- Sitio de internet "Avicultura.com" (2013). Desinfección del huevo incubable. <https://avicultura.com/desinfeccion-de-huevo-incubable/> (último acceso: 8/4/2020).
- Sitio web Climate-Data.org <https://es.climate-data.org/america-del-sur/argentina/buenos-aires/lujan-1890/> (último acceso: 8/4/2020).
- Skariyachan S (2016). Assessment of antibiotic resistance patterns of the fecal coliforms isolated from Cauvery River and screening of novel herbal lead molecules against probable drug targets of MDR pathogens by computational virtual screening. *International Journal of Infectious Diseases*, 45(1): 116.
- Skinner JT, Bauer S, Young V, Pauling G, Wilson J (2010). An economic analysis of the impact of subclinical (mild) necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Diseases*, 54(4):1237-40.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR (2015). Fundamentos de química analítica. Novena edición. ISBN: 978-607-519-937-6
- Slonczewski JL, Fujisawa M, Dopson M, Krulwich TA (2009). Cytoplasmic pH Measurement and Homeostasis in Bacteria and Archaea. *Advances in Microbial Physiology*, 55. DOI: 10.1016/S0065-2911(09)05501-5
- Srinivas D, Mital BK, Garg SK (1990). Utilization of sugars by *Lactobacillus acidophilus* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 10(1): 51-57.
- Stanley D, Hughes RJ, Moore RJ (2014). Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98:4301-4310.
- Stecher B, Robbiani R, Walker AW, Westendorf AM, Barthel M, Kremer M, Chaffron S, Macpherson AJ, Buer J, Parkhill J, Dougan G, von Mering C, Hardt WD (2007). *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLOS Biology*, (10): 2177-89. doi: 10.1371/journal.pbio.0050244.
- Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, Keersmaecker SCJ (2012). *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 45:502-531.

- Steiner T. 2006. Managing Gut Health. Nottingham University, Austria.
- Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2): 175–179.
- Stratford M & Anslow PA (1998). Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic 'weak acid preservative'. *Letters in Applied Microbiology*, 27: 203-206.
- Sun X, McElroy A, Webb KE, Sefton AE, Novak C (2005). Broiler performance and intestinal alterations when fed drug-free diets. *Poultry Science*, 84(8): 1294-1302.
- Suresh G, Ubaldo Santos D, Rouissi T, Hegde K, Kaur Brar S, Mehdi S, Godbout S, Chorfi Y, Avalos Ramirez A (2020). In-field poultry tests to evaluate efficacy of bioformulation consisting of enzymes and yeast biomass. *Animal Feed Science and Technology*, ISSN 0377-8401, <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114398>.
- Suskovich J, Kos B, Beganovich J, Pavunc A, Habjanic K, Matosich S (2010). Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3): 296-307.
- Swayne DE (2013) Diseases of Poultry. 13a ed. Editado por D. E. Swayne et al. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. Disponible en: <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0470958995.html>.
- Taheri H, Tabandeh F, Moravej H, Zaghari M, Shivazad M, Shariati P (2009). Potential probiotic of *Lactobacillus johnsonii* LT171 for chicken nutrition. *African Journal of Biotechnology*, 8:5833-5837.
- Tahmourespour A & Kermanshahi RK (2011). The effect of a probiotic strain (*Lactobacillus acidophilus*) on the plaque formation of oral streptococci. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 11: 37-40.
- Tan Y, Leonhard M, Moser D, Schneider-Stickler B (2017). Inhibition activity of *Lactobacilli* supernatant against fungal-bacterial multispecies biofilms on silicone. *Microbial Pathogenesis*, 113: 197-201. doi:10.1016/j.micpath.2017.10.051
- Tareb R, Bernardeau M, Gueguen M, Vernoux JP (2013). *In vitro* characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic *Lactobacillus* strains and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially *Campylobacter jejuni*. *Journal of Medical Microbiology*, 62(4): 637-49. doi: 10.1099/jmm.0.049965-0.
- Tatsadjieu Ngoune L, Njintang N, Kemgang Sonfack T, Daoudou B, Mbofung C (2009). Characterization of lactic acid bacteria producing bacteriocins against chicken *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *African Journal of Microbiology Research*, 3: 220-227.
- Tejerosariñena S, Barlow J, Costabile A, Gibson GR, Rowland I (2012). *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, 18(5): 530-538. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.08.004>
- Tellez G, Latorre J D, Kuttappan VA, Hargis BM, Hernandez-Velasco X (2015). Rye affects bacterial translocation, intestinal viscosity, microbiota composition and bone mineralization in Turkey poults. *PLoS one*, 10(4), e0122390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122390>
- Tellez G, Petrone VM, Escorcía M, Morishita TY, Cobb CW, Villaseñor L (2001). Evaluation of avian-specific probiotic and *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, and *Salmonella heidelberg* specific antibodies on cecal colonization and organ invasion of *Salmonella enteritidis* in broilers. *Journal of Food Protection*, 5: 287-291.
- Tennant BC & Center SA (2008). Hepatic Function. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, pp: 379-412.
- The Center of Food Security & Public Health (2009). Tifosis aviar y Pullorosis. Iowa State University. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/tifosis_aviar_y_pullorosis.pdf (último acceso: 8/4/2020)
- Therdathata P, Tandumrongpong C, Pilasombut K, Matsusaki H, Keawsompong S, Nitisinprasert S (2016). Characterization of antimicrobial substance from *Lactobacillus salivarius* KL-D4 and its

- application as biopreservative for creamy filling. Springerplus, 12;5(1): 1060. doi: 10.1186/s40064-016-2693-4.
- Thompson JN (2001). Coevolution. in: Encyclopedia of Life Sciences, London, Nature Publishing Group.
 - Thu TV, Foo HL, Loh TC, Bejo MH (2013). Inhibitory activity and organic acid concentrations of metabolite combinations produced by various strains of *Lactobacillus plantarum*. *African Journal of Biotechnology*, 10(8): 1359–1363.
 - Timmerman HM, Veldman A, Van den Elsen E, Rombouts FM, Beynen AC (2006). Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics. *Poultry Science*, 85:1383-1388. doi: 10.1093/ps/85.8.1383.
 - Toba T, Yoshioka E, Itoh T (1991). Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus* LAPT 1060. *Letters in Applied Microbiology*, 12:106-108. doi:10.1111/j.1472-765X.1991.tb00516.x
 - Toghyani M, Mosavi S, Modaresi M, Landy N (2015). Evaluation of kefir as a potential probiotic on growth performance, serum biochemistry and immune responses in broiler chicks. *Animal Nutrition*, 1(4): 305-309.
 - Toghyani M, Toghyani M, Gheisari A, Ghalamkari G, Eghbalsaied S (2011). Evaluation of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler chicks. *Livestock Science*, 138:167-173.
 - Torok VA, Allison GE, Percy NJ, Ophel-Keller K, Hughes RJ (2011). Influence of antimicrobial feed additives on broiler commensal posthatch gut microbiota development and performance. *Applied Environmental Microbiology*, 77: 3380-3390.
 - Traldi AB, Olivera MC, Duarte KF, Barbosa de Moraes VM (2007). Avaliação de probióticos na dieta de frangos de corte criados em cama nova ou reutilizada. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36(3): 660-665.
 - Tufarelli V, Desantis S, Zizza S, Laudadio V (2010). Performance, gut morphology, and carcass characteristics of fattening rabbits as affected by particle size of pelleted diets. *Archives Animal Nutrition*, 64: 373-382.
 - Tulumoglu S, Kaya HI, Simsek O (2014). Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese. *Anaerobe* 30:120–125.
 - Tuo Y, Song X, Song Y, Liu W, Tang Y, Gao Y, Jiang S, Qian F, Mu G (2018). Screening probiotics from *Lactobacillus* strains according to their abilities to inhibit pathogen adhesion and induction of pro-inflammatory cytokine IL-8. *Journal of Dairy Science*, 101(6):4822-4829. doi:10.3168/jds.2017-13654
 - Tuo Y, Yu H, Ai L, Wu Z, Guo B, Chen W (2013). Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science*, 96(7):4252-4257. doi:10.3168/jds.2013-6547
 - Turnidge J (2004). Antibiotic use in animals-prejudices, perceptions and realities. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53:26-27.
 - Udhayashree N, Senbagam D, Senthilkumar B, Nithya K, Gurusamy R (2012). Production of bacteriocin and their application in food products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1):S406-S410.
 - Uni Z, Noy Y, Sklan D (1996). Developmental parameters of the small intestine in heavy and light strain chicks pre and post-hatch. *British Poultry Science*, 36:63-71.
 - Uni Z, Platin R, Sklan D (1998). Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villi. *Journal Comparative Physiology*, 168: 241-247.
 - Valladares de la Cruz (2014). Necropsias en aves. Sitio Argentino de Producción Animal. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_aves/enfermedades_aves/30-Necropsias_en_Aves.pdf (último acceso: 8/4/2020).

- Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18): 5649-54.
- Van Coillie E, Goris J, Cleenwerck I, Grijspeerd K, Botteldoorn N, Van Immerseel F, De Buck J, Vancanneyt M, Swings J, Herman L, Heyndrickx M (2007). Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella Enteritidis*. *Journal of Applied Microbiology*, 102:1095-1106.
- Van De Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD, Maguin E (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82:187-216. doi:10.1023/A:1020631532202.
- van den Bogaard AE & Stobberingh EE (1999). Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. *Drugs*, 58(4): 589-607.
- Van Der Wielen PWJJ, Keuzenkamp DA, Lipman LJA, Van Knapen F, Biesterveld S (2002). Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. *Microbial Ecology*, 44:286-293.
- Van Immerseel F, Russell JB, Flythe MD, Gantois I, Timbermont L, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R (2006). The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathology*, 35(3): 182-188. doi: 10.1080/03079450600711045
- Van Nevel CJ, Decuyper JA, Dieric NA, Moll K (2005). Incorporation of galactomannans in the diet of newly weaned piglets: Effect on bacteriological and some morphological characteristics of the small intestine. *Archives Animal Nutrition*, 59: 123-138.
- Vandenberg PA (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth, *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3): 221-237, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00020.x>
- Vandeplass S, Dubois Dauphin R, Beckers Y, Thonart P, Thewis A (2010). Salmonella in chicken: current and developing strategies to reduce contamination at farm level. *Journal of Food Protection*, 73: 774-785.
- Venturino JJ (Biofarma). Manejo de parrilleros en las primeras semanas de vida. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_aves/produccion_avicola/33-manejo_parilleros.pdf (último acceso: 8/4/2020).
- Vianna Nunes R, Scherer C, Pozza PC, Eyng C, Giusti Bruno LD, Vieites Medeiros F (2012). Use of probiotics to replace antibiotics for broilers. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(10): 2219-2224. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012001000012>
- Vicente J, Higgins S, Bielke L, Tellez G, Donoghue D, Donoghue A, Hargis B (2007). Effect of Probiotic Culture Candidates on *Salmonella* Prevalence in Commercial Turkey Houses. *Journal of Applied Poultry Research*, 16(3):471-476.<https://doi.org/10.1093/japr/16.3.471>.
- Vidra A, Tóth AJ, Németh A (2017). Lactic acid production from cane molasses. *Liquid Waste Recovery*, 2: 13-16.
- Vignolo G, Fadda S, de Kairuz MN, de Ruiz Holgado AAP, Oliver G (1996). Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by 'Lactocin 705', a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2-3): 397-402.
- Vilà B, Fontgibell A, Badiola I, Esteve-Garcia E, Jimenez G, Castillo M, Brufau J (2009). Reduction of *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. toyoi inclusion in poultry feeds. *Poultry Science*, 88:975-979.
- Villareal F (2002). Trabajo de Tesis de Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos: "Aislamiento y caracterización de lactobacilos intestinales con potencial probiótico". Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/399/tesis.pdf?sequence=3&isAllowed=y> (último acceso: 8/4/2020)
- Vitali B, Minervini G, Rizzello CG, Spisni E, Maccaferri S, Brigidi P, Gobbetti M, Di Cagno R(2012). Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. *Food Microbiology*, 31(1):116-25. doi:10.1016/j.fm.2011.12.027

- Vlková E, Rada V, Šmehilová M, Killer J (2008). Auto-aggregation and co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia. *Folia Microbiol. (Praha)*, 53: 263-269.
- Wagner C & Hensel M (2011). Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 715:17-34.
- Wang H, Yan Y, Wang J, Zhang H, Qi W (2012). Production and Characterization of Antifungal Compounds Produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PLoS ONE* 7(1): e29452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029452>
- Wang L, Fang M, Hu Y, Yang Y, Yang M, Chen Y (2014). Characterization of the most abundant *Lactobacillus* species in chicken gastrointestinal tract and potential use as probiotics for genetic engineering, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 46(7): 612-619,
- Wati T, Ghosh TK, Syed B, Haldar S (2015). Comparative efficacy of a phytogetic feed additive and an antibiotic growth promoter on production performance, caecal microbial population and humoral immune response of broiler chickens inoculated with enteric pathogens. *Animal Nutrition*, 1:213-219.
- Webster P. (2009). The perils of poultry. *Canadian Medical Association Journal*, 181(1-2), 21-24. <https://doi.org/10.1503/cmaj.091009>
- West JB (1996). Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. Editorial Médica Panamericana. Cap. 6, 731-850.
- White S, Tuttle FE, Blankenhorn D, Dosch DC, Slonczewski JL (1992). pH dependence and gene structure of *inaA* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174: 1537-1543.
- Williams R (1999). A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *International Journal of Parasitology*, 29(8): 1209-1229.
- Willis WL & Reid L (2008). Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. *Poultry Science*, 87: 606-611.
- Windisch W, Schedle K, Plitzner C, Kroismayr A (2008). Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science*, 86:E140-E148.
- Woke B (2007). How cryoprotectants work. In *Cryonics*, Vol. 28: 3 (Chapman J., ed), p. 3-7. Alcor Life Extension Foundation, Arizona.
- Wolford JH & Polin D (1972). Lipid accumulation and hemorrhage in livers of laying chickens. A study on fatty liver-hemorrhagic syndrome (FLHS). *Poultry Science*, 51(5): 1707-1713.
- Woo J & Ahn J (2013). Probiotic mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by foodborne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 56:307-313. doi:10.1111/lam.12051
- World Health Organization WHO (2011). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. 3rd Revision. Switzerland.
- Xu CL, Ji C, Ma Q, Hao K, Jin ZY, Li K (2006). Effects of a dried *Bacillus subtilis* culture on egg quality. *Poultry Science*, 85:364-368.
- Yadav S & Jha R (2019). Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10, 2. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0310-9>
- Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers Microbiology*, 5: 241.
- Yarlagadda V, Samaddar S, Paramanandham K, Shome BR, Haldar J (2015). Membrane disruption and enhanced inhibition of cell-wall biosynthesis: A synergistic approach to tackle vancomycin-resistant bacteria. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(46): 13644-13649.
- Yassin H, Velthuis AGJ, Boerjan M, Van Riel J (2009). Field study on broilers: first-week mortality. *Poultry Science*, 88(4): 798-804.
- Yegani M & Korver DR (2008). Factors Affecting Intestinal Health in Poultry. *Poultry Science*, 87(10): 2052-2063. doi: 10.3382/ps.2008-00091

- Yeo J & Kim K (1997). Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic, or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. *Poultry Science*, 76: 381-385.
- Yeoman CJ, Chia N, Jeraldo P, Sipos M, Goldenfeld ND, White BA (2012). The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Animal Health Research Reviews*, 13:89-99. 10.1017/s1466252312000138
- Yerpes M, Sales R, Hernández I, Manteca X (2018). “Relación entre el estrés térmico en pollitos broiler de un día de vida y al mortalidad durante la primera semana de vida” Trabajo presentado por los autores en el LIV Symposium Científico de Avicultura (León, España. Septiembre de 2017) <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/relacion-entre-estres-termico-t42777.htm> (último acceso: 8/4/2020).
- Yin YN, Yan LY, Jiang JH, Ma ZH (2008). Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Zhejiang University Science B* 9(10):787-92. doi: 10.1631/jzus.B0860003.
- Yörük MA, Gül M, Hayirli A, Macit M (2004). The effects of supplementation of humate and probiotic on egg production and quality parameters during the late laying period in hens. *Poultry Science*, 83(1): 84-88.
- Yu B & Tsen HY (1993) *Lactobacillus* cells in the rabbit digestive tract and the factors affecting their distribution. *Journal of Applied Microbiology*, 75(3):269-75.
- Yu B, Liu JR, Chiou MY, Hsu YR, Chiou PWS (2007). The Effects of Probiotic *Lactobacillus reuteri* Pg4 Strain on Intestinal Characteristics and Performance in Broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 20(8):1243-1251
- Zachos NC (2016). Gastrointestinal Physiology & Pathophysiology., in *Viral Gastroenteritis: Molecular Epidemiology and Pathogenesis*, pp. 1-21.
- Zalán Z, Hudacek J, Stetina J, Chumchalova J and Halasz A (2010). Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. *European Food Research and Technology*, 230: 395-404.
- Zárate G & Nader-Macias ME (2006). Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2): 174-180.
- Zhang AW, Lee BD, Lee SK, Lee KW, An GH, Song KB (2005). Effects of yeast (*Saccharomyces Cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. *Poultry Science*, 84:1015-1021.
- Zhang G, Ma L, Doyle MP (2007). Salmonellae reduction in poultry by competitive exclusion bacteria *Lactobacillus salivarius* and *Streptococcus cristatus*. *Journal of Food Protection*, 70(4): 874-878.
- Zhang Z, Lv J, Pan L, Zhang Y (2018). Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102:8135-8143
- Zhang ZF & Kim IH (2014). Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. *Poultry Science*, 93(2): 364-370. doi: 10.3382/ps.2013-03314
- Zielińska D, Rzepkowska A, Radawska A, Zieliński K (2015). *In vitro* screening of selected probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented cabbage and cucumber. *Current Microbiology*, 70:183–194.
- Zommiti M, Connil N, Ben Hamida J, Ferchichi M (2017). Probiotic Characteristics of *Lactobacillus curvatus* DN317, a Strain Isolated from Chicken Ceca. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, DOI 10.1007/s12602-017-9301-y

ANEXOS

Anexo 1

Incorporación de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 y zeolita en alimentación aviar



Incorporation of *Lactobacillus plantarum* and zeolites in poultry feed can reduce aflatoxin B1 levels

Ana F. Moretti¹ · Raúl R. Gamba¹ · Jorge Puppo¹ · Norberto Malo³ ·
 Andrea Gómez-Zavaglia² · Ángela León Peláez¹ · Marina A. Golowczyc²

Revised: 25 September 2017 / Accepted: 9 October 2017 / Published online: 4 November 2017
 © Association of Food Scientists & Technologists (India) 2017

Abstract The aim of this work was to evaluate the incorporation of a freeze-dried probiotic strain (*Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114) into zeolites. The bacteria-zeolite mixture was added to poultry feed together with thyme, and the obtained product was stored for 60 days at 25 °C and 60–70% relative humidity. The ability of the obtained product to remove aflatoxin B1 (AFB1) was studied. The highest bacterial viability was observed when 50% w/w bacteria were added to zeolites. The bacterial:zeolite mixtures were then incorporated into poultry feed containing or not thyme. Initial counts of *L. plantarum* were in the range of $1\text{--}2 \times 10^8$ CFU/g for all samples. In all cases, bacterial viability decreased one logarithmic order after 20 days of storage, and three logarithmic orders after 60 days. No significant viability loss was observed after exposure of the poultry feed to gastrointestinal conditions. Freeze-dried *L. plantarum* and zeolite were able to remove AFB1, with an average reduction of 20 and 80%, respectively. Moreover, the freeze-dried bacteria-zeolite mixture was capable to remove up to 90% AFB1. This work contributes to enhance the nutritional quality of poultry feed, with a strong impact in production.

Keywords *Lactobacillus plantarum* · Poultry feed · Zeolite · Aflatoxin B1

Introduction

The nutritional quality of poultry feed is crucial for many aspects of production, including productivity, health, protection against pathogens or detoxification and modulation of the immune system among others (Chaucheyras-Durand and Durand 2010; Stanley et al. 2014). Feedstuffs containing additives promoting optimal gastrointestinal environment may contribute to decrease infections by enhancing the concentration of beneficial bacteria (*i.e.*: lactic acid bacteria) (Mookiah et al. 2014).

Since 2006, the European Union and other countries have prohibited the use of antibiotics as growth promoters in poultry. As alternatives to prevent the proliferation of pathogenic bacteria and maintain digestive health and production levels, a wide range of available products (*i.e.*, probiotics, prebiotics, phytochemicals, exogenous enzymes and acidification) have demonstrated a good performance. Using probiotics promotes an adequate bal-

Anexo 2

Variaciones en la microbiota intestinal: evaluación por Real Time PCR

1. Objetivos

Estudiar las modificaciones en la microbiota del animal durante el suministro de probióticos en el ensayo *in vivo* mediante análisis por Real Time-PCR (RT-PCR) del ADN extraído de heces y/o contenido intestinal.

2. Metodología

A partir de los dos ensayos *in vivo* de administración de bacterias probióticas en producción aviar (**Capítulo 3**), se procedió a determinar si existen variaciones en el perfil microbiano mediante qPCR. El equipo utilizado fue CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (© 2020 Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Para ello se recolectaron muestras de materia fecal (a partir de los ciegos de cada animal) y se conservaron a -80°C para realizar posteriormente la extracción de DNA, utilizando kit de extracción Geneaid Presto Mini gDNA Bacteria kit). Para la amplificación de las regiones génicas se utilizaron primers específicos, los cuales se detallan en la siguiente tabla:

Microorganismo	PRIMER ID	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	<i>Ecoli</i>	EcoliFW: CATGCCGCGTGTAT GAAGA	EcoliRV: CGGGTAACGTCAAT GAGCAA	Huijsdens et al., 2002
<i>Salmonella spp.</i>	<i>invA</i>	AGCGTACTGGAAAG GGAAAG	ATACCGCCAATAAA GTTCAAAAAG	Kasturi and Drgon, 2017
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>alpha-toxin gene(at gene)</i>	ATGATTGGGATTATG CAGCAA	TCCATCCTTTGTTTT GATTCCA	Fu et al., 2005
<i>Lactobacillus agilis</i>	<i>Lag</i>	GGCACTCTTGATTGT AGCCG	CAAAGTTGCACCGG TCAAGA	Diseñado
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lsal</i>	GGTGACAAGGACAA GATCGC	TAAGTGCACACCA CCAGA	Diseñado
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lpla</i>	TGGTGATGGGACGA CTACTG	TAATGAGTCAACCG CCGTC	Diseñado
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Ent</i>	CCCTTATTGTTAGTT GCCATCATT	ACTCGTTGTAATTC CCATTGT	Rinttilä et al., 2004
<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Bif</i>	AATCCCGGTGTAAC GGTGG	CTAATCCTGTTCCG TCCCA	Diseñado

El esquema de trabajo planteado para cada grupo de microorganismos (*E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus salivarius* y *L. plantarum*) se realizó de acuerdo a los siguientes pasos:

- 1°- Selección de la T de annealing óptima para cada par de primers específicos.
- 2°- Constatación de ausencia de amplificación inespecífica (formación de dímeros de primers) o cruzada (amplificación de DNA de un género microbiano diferente al de interés).
- 3°- Evaluación de la presencia de diferentes concentraciones de todos los DNA para constatar que no hay interferencia en cada amplificación individual.
- 4°- Evaluación de la posible interferencia de la matriz (materia fecal) en la extracción/amplificación del DNA.
- 5°- Obtención de las curvas estándar del rango dinámico para cada especie a estudiar, a partir de cultivos microbianos puros.
- 6°- Extracción de DNA de cada muestra de materia fecal y, determinación de la concentración de la población microbiana a evaluar.

3. Resultados:

1°- Selección de la T de annealing óptima para cada par de primers específicos:

Para cada par de primers se evaluó un rango de T de annealing, a fin de seleccionar la T óptima para trabajar. El rango evaluado fue de 50-65°C, utilizando las temperaturas de trabajo (definidas automáticamente por el equipo): 50°C, 55°C, 59,5°C y 65°C. El protocolo elegido se detalla a continuación:

1° paso: 95,0°C por 5'

2° paso: CICLOS (n: 35), constituidos por 3 etapas:

2.1- Desnaturalización: 95°C por 15"

2.2- Annealing: rango 50-65°C, 30"

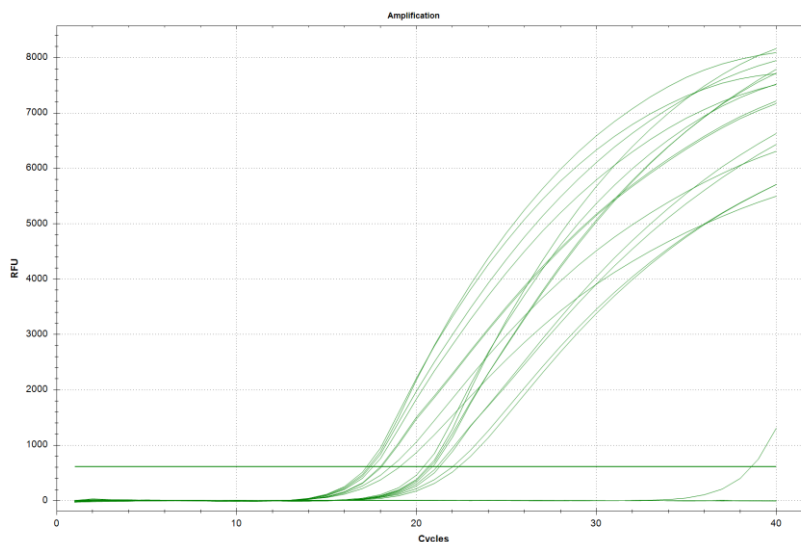
2.3- Extensión: 72°C por 15" Plate Read (lectura)

3° paso: Extensión final: 72,0°C por 10'

4° paso: Curva de melting: rango de 40°C a 95°C, con aumentos de 0,5°C cada 5". Plate Read (lectura).

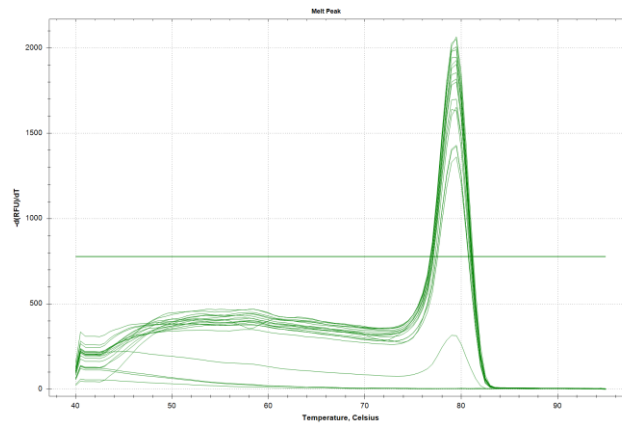
A continuación, se presenta a modo de ejemplo la curva de amplificación de las concentraciones directa y dilución 1/10, la tabla con valores de Cq y la curva de melting obtenidas para el par de primers del género *Salmonella*, en el rango de temperaturas de annealing evaluadas:

Curva de amplificación:



Well	Floor	Target	Control	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting Quantity	SQ Mean	SQ Std. Dev
A01	SYBR	Std-1	Directo		18,57	17,89	0,543	2,850E+08	8,423	2,85E+08	0,00E+00
A02	SYBR	Std	Directo		19,08	19,08	0,000	2,850E+08	8,423	2,85E+08	0,00E+00
A03	SYBR	Std-3	Dilución -1		22,02	21,11	0,681	2,850E+07	7,423	2,85E+07	0,00E+00
A04	SYBR	Std	Dilución -1		22,35	22,35	0,000	2,850E+07	7,423	2,85E+07	0,00E+00
A05	SYBR	NTC-5	Control (-)		N/A	0,00	0,000	N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00
D01	SYBR	Std-1	Directo		17,35	17,89	0,543	2,850E+08	8,423	2,85E+08	0,00E+00
D02	SYBR	Std	Directo		17,23	17,23	0,000	2,850E+08	8,423	2,85E+08	0,00E+00
D03	SYBR	Std-3	Dilución -1		20,39	21,11	0,681	2,850E+07	7,423	2,85E+07	0,00E+00
D04	SYBR	Std	Dilución -1		20,66	20,66	0,000	2,850E+07	7,423	2,85E+07	0,00E+00
D05	SYBR	NTC-5	Control (-)		18,61	18,61	0,000	N/A	N/A	N/A	0,00E+00
E01	SYBR	Std-1	Directo		17,59	17,89	0,543	2,850E+08	8,423	2,85E+08	0,00E+00
E02	SYBR	Std	Directo		17,44	17,44	0,000	2,850E+08	8,423	2,85E+08	0,00E+00
E03	SYBR	Std-3	Dilución -1		20,89	21,11	0,681	2,850E+07	7,423	2,85E+07	0,00E+00
E04	SYBR	Std	Dilución -1		20,75	20,75	0,000	2,850E+07	7,423	2,85E+07	0,00E+00
E05	SYBR	NTC-5	Control (-)		N/A	0,00	0,000	N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00
H01	SYBR	Std-1	Directo		18,06	17,89	0,543	2,850E+08	8,423	2,85E+08	0,00E+00
H02	SYBR	Std	Directo		18,00	18,00	0,000	2,850E+08	8,423	2,85E+08	0,00E+00
H03	SYBR	Std-3	Dilución -1		21,14	21,11	0,681	2,850E+07	7,423	2,85E+07	0,00E+00
H04	SYBR	Std	Dilución -1		21,29	21,29	0,000	2,850E+07	7,423	2,85E+07	0,00E+00
H05	SYBR	NTC-5	Control (-)		N/A	0,00	0,000	N/A	N/A	0,00E+00	0,00E+00

Curva de melting:



La T° de melting (79,5°C) es la misma para todos los productos de amplificación obtenidos.

2°- Constatación de ausencia de amplificación inespecífica (formación de dímeros de primers) o cruzada (amplificación de DNA de un género microbiano diferente al de interés).

Una vez seleccionada la T° de annealing óptima, se analizó que a esa T° no existiera otra amplificación que no fuera la del DNA de interés para cada caso; por lo que se evaluaron cada par de primers con todos los DNA, de forma individual. En los casos en que fue necesario (la amplificación no era específica), se realizó un reajuste de la T de annealing y diluciones en la concentración del DNA de trabajo.

A continuación, se detallan los pasos seguidos para cada uno de los primers:

-Primers de *L. salivarius* 1234C:

T annealing 59,5°C y DNA de todos los microorganismos a evaluar en la muestra de materia fecal, en concentración directa. Resultado: sólo amplificó el DNA de *L. salivarius* 1234C.

-Primers para *L. plantarum* (*L. plantarum* 1235C):

Se resume el trabajo realizado en el siguiente cuadro:

T annealing	DNA	Concentración directa	Dilución 1/20	Dilución 1/50	Dilución 1/100
59,5°C		Amplificaron todos los aislados			
65°C		Sólo amplificaron los aislados <i>L. plantarum</i> 1234C, 1235C y <i>Enterococcus</i> sp.	Amplificaron los aislados <i>L. plantarum</i> 1234C y 1235C	Amplificaron los aislados <i>L. plantarum</i> 1234C y 1235C	
67°C		Amplificaron los aislados <i>L. plantarum</i> 1234C y 1235C	Amplificaron los aislados <i>L. plantarum</i> 1234C y 235C	Sólo amplificó <i>L. plantarum</i> 1235C	Sólo amplificó <i>L. plantarum</i> 1235C

-Primers para *Escherichia coli*:

T annealing 65°C y DNA de todos los microorganismos a evaluar en la muestra de materia fecal, en concentración directa. Resultado: Sólo amplificó el DNA de *Escherichia coli*.

-Primers para *Clostridium* sp.:

T annealing	DNA	Concentración directa	Dilución 1/20
59,5°C		Amplificó <i>Clostridium</i> sp. y <i>E. coli</i>	Sólo amplificó <i>Clostridium</i> sp.
65°C		Sólo amplificó <i>Clostridium</i> sp. (pero a valores de Ct elevados)	No hubo amplificación

-Primers para *Enterococcus* sp.:

Se resume el trabajo realizado en el siguiente cuadro.

T annealing	DNA	Concentración directa	Dilución 1/20	Dilución 1/50	Dilución 1/100
50°C			Amplificó <i>Enterococcus</i> sp., <i>Salmonella</i> sp. (control-) y agua (NTC), pero hubo pico de melting sólo p/ <i>Enterococcus</i> sp.	Amplificó <i>Enterococcus</i> sp., <i>Salmonella</i> sp. (control-) y agua (NTC), pero hubo pico de melting sólo p/ <i>Enterococcus</i> sp.	
			Primers a 0,15 uM (menor conc.): amplificó <i>Enterococcus</i> sp. a la dilución 1/20 y 1/50, y además <i>Salmonella</i> sp. y agua. Curva de melting sólo del <i>Enterococcus</i> .		
55,9°C			Amplificó <i>Enterococcus</i> sp., <i>Salmonella</i> sp. (control-) y agua (NTC), pero hubo pico de melting sólo p/ <i>Enterococcus</i> sp.	Amplificó <i>Enterococcus</i> sp., <i>Salmonella</i> sp. (control-) y agua (NTC), pero hubo pico de melting sólo p/ <i>Enterococcus</i> sp.	
			Primers a 0,15 uM (menor conc.): amplificó <i>Enterococcus</i> sp. a la dilución 1/20 y 1/50, y además <i>Salmonella</i> sp. y agua. Curva de melting sólo del <i>Enterococcus</i> .		
59,5°C		Amplificó todo	Amplificó todo		
65°C		Hubo amplificación no específica de <i>Salmonella</i> sp. y <i>L. plantarum</i> 1234C (sin pico de melting)	Sólo amplificó <i>Enterococcus</i> sp.	No hubo amplificación	

-Primers para *Bifidobacterium* sp.:

T annealing 65°C y DNA de todos los microorganismos a evaluar en la muestra de materia fecal, en concentración directa (más DNA de *Bifidobacterium*, dilución 1/20). Sólo amplificó el DNA de *Bifidobacterium*, en las dos concentraciones evaluadas.

-Primers para *Salmonella* sp.:

T annealing 65°C y DNA de todos los microorganismos a evaluar en la muestra de materia fecal, en concentración directa. Sólo amplificó el DNA de *Salmonella*.

A modo de resumen, se presentan en la siguiente tabla las concentraciones y las T° de annealing seleccionadas para hacer las determinaciones mediante qPCR:

Microorganismo	Concentración de DNA	T annealing (°C)
<i>L. salivarius</i> 1234C	Directa	59,5
<i>L. plantarum</i> 1235C	1/50 o 1/100	67
<i>Escherichia coli</i>	Directa	65
<i>Clostridium</i>	1/20	59,5
<i>Enterococcus</i> sp.		
<i>Bifidobacterium</i>	Directa	65
<i>Salmonella</i>	Directa	65

3°- Evaluación de la presencia de diferentes concentraciones de todos los DNA para constatar que no hay interferencia en cada amplificación individual

Se evaluó si la presencia de otros DNA en la mezcla de reacción afecta la amplificación. Iniciamos el ensayo con la mezcla de sólo dos DNA, para luego complejizarla hasta llegar a la mezcla de todos los DNA (que sería lo más cercano a las condiciones reales en la materia fecal).

A continuación, se observa, a modo de ejemplo, los cálculos realizados para evaluar estas mezclas complejas. No se incluyeron *Enterococcus* sp. ni *L. plantarum* 1235C, que fueron los dos géneros donde encontramos más inconvenientes durante la determinación de T° annealing.

PRIMERS	DNA	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bifidobacteriu msp.</i>	<i>Clostridiu msp.</i>	<i>L. salivarius 1234C</i>
<i>Salmonella</i> sp.		CONTROL (+) 1:5 0,2ul Salm+1ul agua 1:10 0,2ul Salm+2ul agua	1:5 0,2ul Salm+1ul E. coli 1:10 0,2ul Salm+2ul E. coli	1:5 0,2ul Salm+1ul Bifid 1:10 0,2ul Salm+2ul Bifid	1:5 0,2ul Salm+1ul Clostri 1:10 0,2ul Salm+2ul Clostri	1:5 0,2ul Salm+1ul 34C 1:10 0,2ul Salm+2ul 34C
<i>Escherichia coli</i>		1:5 0,2ul E.coli +1ul Salm 1:10 0,2ul E.coli +2ul Salm	CONTROL (+) 1:5 0,2ul E.coli 1ul agua 1:10 0,2ul E.coli +2ul agua	1:5 0,2ul E.coli +1ul Bifid 1:10 0,2ul E.coli +2ul Bifid	1:5 0,2ul E.coli +1ul Clostri 1:10 0,2ul E.coli +2ul Clostri	1:5 0,2ul E.coli +1ul 34C 1:10 0,2ul E.coli +2ul 34C
<i>Bifidobacterium</i> sp		1:5 0,2ul Bifid +1ul Salm 1:10 0,2ul Bifid +2ul Salm	1:5 0,2ul Bifid +1ul E.coli 1:10 0,2ul Bifid +2ul E.coli	CONTROL (+) 1:5 0,2ul Bifid +1ul agua 1:10 0,2ul Bifid +2ul agua	1:5 0,2ul Bifid +1ul Clostri 1:10 0,2ul Bifid +2ul Clostri	1:5 0,2ul Bifid +1ul 34C 1:10 0,2ul Bifid +2ul 34C
<i>Clostridium</i> sp.		1:5 0,2ul Clostri +1ul Salm 1:10 0,2ul Clostri +2ul Salm	1:5 0,2ul Clostri +1ul E.coli 1:10 0,2ul Clostri +2ul E.coli	1:5 0,2ul Clostri +1ul Bifid 1:10 0,2ul Clostri +2ul Bifid	CONTROL (+) 1:5 0,2ul Clostri +1ul agua 1:10 0,2ul Clostri +2ul agua	1:5 0,2ul Clostri +1ul 34C 1:10 0,2ul Clostri +2ul 34C
<i>L. salivarius 1234C</i>		1:5 0,2ul 34C +1ul Salm 1:10 0,2ul 34C +2ul Salm	1:5 0,2ul 34C +1ul Clostri 1:10 0,2ul 34C +2ul Clostri	1:5 0,2ul 34C +1ul Bifid 1:10 0,2ul 34C +2ul Bifid	1:5 0,2ul 34C +1ul Clostri 1:10 0,2ul 34C +2ul Clostri	CONTROL (+) 1:5 0,2ul 34C +1ul agua 1:10 0,2ul 34C + 2ul agua

Al trabajar con soluciones de DNA de diferente concentración (con un rango amplio entre 14,7 ng/μl y 109,9 ng/μl), se estandarizaron las mismas llevándolas a una concentración de 5 ng/μl, en un volumen final de 40 μl.

Las mix de cada una de las relaciones de DNA a evaluar (1:5 y 1:10) se prepararon de la siguiente forma:

- Mix de DNA en relación 1:5 (volumen de “DNA TOTAL” en la mezcla: = 0,2 µl DNA a evaluar+1 µl DNA “externo”)

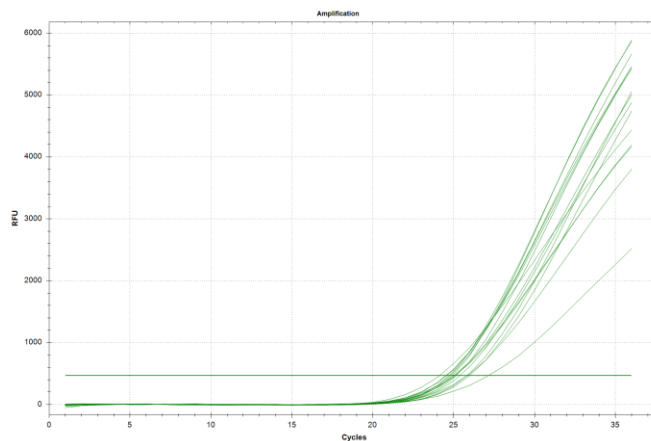
Master mix: 10 ul	10 ul
Primer Forward: 0,6 ul	0,6 ul
Primer Reverse: 0,6 ul	0,6 ul
DNA: 1 ul	1,2 ul
Agua: 7,8 ul	7,6 ul
TOTAL: 20 ul	20 ul

Para las fosas de control (+), donde solo se adicionó el DNA que debía levantar, el volumen total de “DNA” fue de 0,2 ul + 1 ul de agua.

- Mix de DNA en relación 1:10 (volumen de “DNA” en la mezcla: 0,2 µl DNA a evaluar+2 µl DNA “intruso”)

Master mix: 10 ul	10 ul
Primer Forward: 0,6 ul	0,6 ul
Primer Reverse: 0,6 ul	0,6 ul
DNA: 1 ul	2,2 ul
Agua: 7,8 ul	5,6 ul
TOTAL: 20 ul	20 ul

A modo de ejemplo, se presenta a continuación las curvas obtenidas para los primers de *Salmonella* sp., *E. coli* y *Bifidobacterium* sp. en concentración directa en las corridas (no se hicieron las diluciones 1/10), donde el Ct del ADN de la bacteria individual, debe ser el mismo obtenido cuando se mezcla con otros ADN:



Primers de Salmonella:

Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A06	SYBR		Pos Ctrl	DNA Salm	24,51	24,51	0,000
A07	SYBR		Unkn	DNA E coli+Salm	25,80	25,80	0,000
A08	SYBR		Unkn	DNA Bifid+Salm	24,56	24,56	0,000
A09	SYBR		Unkn	DNA Clostr+Salm	25,10	25,10	0,000
A10	SYBR		Unkn	DNA 34C+Salm	25,99	25,99	0,000

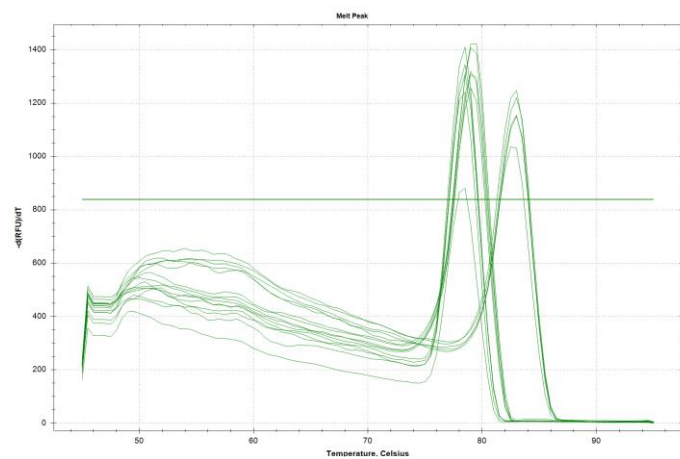
Primers de E. coli:

B06	SYBR		Unkn	DNA Salm+E coli	25,08	25,08	0,000
B07	SYBR		Pos Ctrl	DNA E coli	25,01	25,01	0,000
B08	SYBR		Unkn	DNA Bifid+E col	24,12	24,12	0,000
B09	SYBR		Unkn	DNA Clostr+Ecoli	27,15	27,15	0,000
B10	SYBR		Unkn	DNA 34C+Ecoli	25,83	25,83	0,000

Primers de Bifidobacterium:

C06	SYBR		Unkn	DNA Salm+Bifid	24,90	24,90	0,000
C07	SYBR		Unkn	DNA Ecoli+Bifid	25,15	25,15	0,000
C08	SYBR		Pos Ctrl	DNA Bifid	24,78	24,78	0,000
C09	SYBR		Unkn	DNA Clostr+Bif	24,71	24,71	0,000
C10	SYBR		Unkn	DNA 34C+Bifid	25,37	25,37	0,000

Curva de melting:



Melt Curve Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Melt Temp
A06	SYBR		Pos Ctrl	DNA Salm	79,50
A07	SYBR		Unkn	DNA E coli+Salm	79,00
A08	SYBR		Unkn	DNA Bifid+Salm	79,00
A09	SYBR		Unkn	DNA Clostr+Salm	79,00
A10	SYBR		Unkn	DNA 34C+Salm	79,00
B06	SYBR		Unkn	DNA Salm+E coli	78,50
B07	SYBR		Pos Ctrl	DNA E coli	78,50
B08	SYBR		Unkn	DNA Bifid+E col	78,50
B09	SYBR		Unkn	DNA Clost+Ecoli	78,50
B10	SYBR		Unkn	DNA 34C+Ecoli	78,50
C06	SYBR		Unkn	DNA Salm+Bifid	83,00
C07	SYBR		Unkn	DNA Ecoli+Bifid	83,00
C08	SYBR		Pos Ctrl	DNA Bifid	83,00
C09	SYBR		Unkn	DNA Clostri+Bif	83,00
C10	SYBR		Unkn	DNA 34C+Bifid	82,50

Seguidamente se inició la evaluación de la presencia de los DNA de *Salmonella* sp., *Bifidobacterium* sp., y *E. coli* en cada mezcla de reacción con cada par de primers, por duplicado y con un control (+).

Algunos valores de Cq obtenidos se presentan a continuación:

Primers para *Salmonele*:

Primers para *E. coli*:

G04	SYBR		Unkn	Primer E coli	22,47	22,47	0,000
G05	SYBR		Unkn	Primer E coli	22,51	22,51	0,000
G06	SYBR		Pos Ctrl	Primer E coli	22,51	22,51	0,000

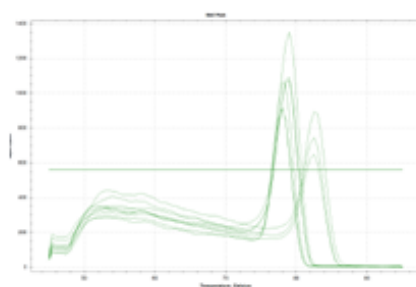
Quantification Data

Well	Floor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
G01	SYBR		Unkn	Primer Salm	21,58	21,58	0,000
G02	SYBR		Unkn	Primer Salm	21,89	21,89	0,000
G03	SYBR		Pos Ctrl	Primer Salm	21,19	21,19	0,000

Primers de *Bifidobacterium*:

Well	Floor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
H01	SYBR		Unkn	Primer Bifid	24,66	24,66	0,000
H02	SYBR		Unkn	Primer Bifid	24,00	24,00	0,000
H03	SYBR		Pos Ctrl	Primer Bifid	23,78	23,78	0,000

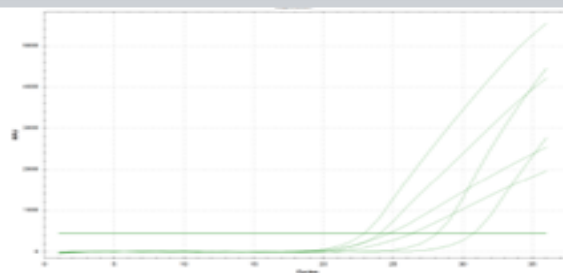
Curva de melting para los tres pares de primers evaluados:



Melt Curve Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Melt Temp
G01	SYBR		Unkn	Primers Salm	79,00
G02	SYBR		Unkn	Primers Salm	79,00
G03	SYBR		Pos Ctrl	Primers Salm	79,00
G04	SYBR		Unkn	Primers E coli	78,00
G05	SYBR		Unkn	Primers E coli	78,00
G06	SYBR		Pos Ctrl	Primers E coli	78,00
H01	SYBR		Unkn	Primers Bifid	82,50
H02	SYBR		Unkn	Primers Bifid	82,50
H03	SYBR		Pos Ctrl	Primers Bifid	82,50

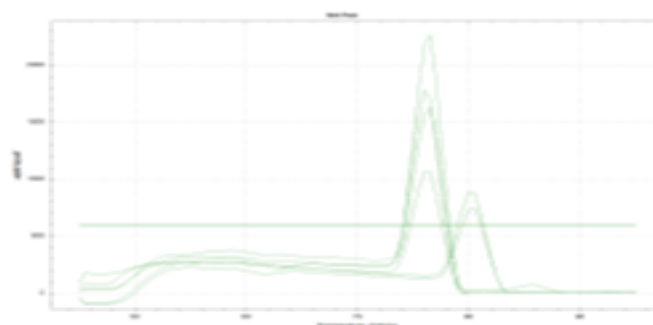
Para el caso de los primers de *Clostridium* sp., *L. salivarius* 1234C y *L. plantarum* 1235C, se presentan los valores de C_q, las curvas de amplificación y y las curvas de melting obtenidas (sin duplicados):



Quantification Data

Well	Floor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A11	SYBR		Unkn	PrimL plant35C	24,67	24,67	0,000
A12	SYBR		Pos Ctrl	PrimL plant35C	26,34	26,34	0,000
E06	SYBR		Unkn	Prim Clostri	24,07	24,07	0,000
E07	SYBR		Pos Ctrl	Prim Clostri	22,93	22,93	0,000
E08	SYBR		Unkn	Prim Lsaliv34C	30,74	30,74	0,000
E09	SYBR		Pos Ctrl	Prim Lsaliv34C	28,13	28,13	0,000

Curvas de melting:



Melt Curve Data

Well	Floor	Target	Content	Sample	Melt Temp
A11	SYBR		Unkn	PrimL plant35C	80,00
A12	SYBR		Pos Ctrl	PrimL plant35C	80,50

Well	Floor	Target	Content	Sample	Melt Temp
E06	SYBR		Unkn	Prim Clostri	76,00
E07	SYBR		Pos Ctrl	Prim Clostri	76,50
E08	SYBR		Unkn	Prim Lsaliv34C	76,50
E09	SYBR		Pos Ctrl	Prim Lsaliv34C	76,50

En resumen, se evaluó la especificidad de la amplificación respecto a cada bacteria en particular, aún en presencia de otras bacterias de diferente género (ya que sería una aproximación a la situación real que se presenta en la materia fecal, donde hay una amplia diversidad de microorganismos). Se obtuvieron resultados positivos para todos los géneros evaluados, a excepción de los lactobacilos, en donde se observó que no hay amplificación específica (salvo que se trabaje a T de annealing muy elevadas y realizando diluciones del DNA).

Dada la gran cantidad de trabajo que es necesario realizar en cada etapa, se decidió optimizar tiempos y recursos, continuando con el estudio de dos cepas patógenas (como son *Salmonella* y *E. coli*) y los lactobacilos que forman parte del probiótico administrado.

4°- Evaluación de la posible interferencia de la matriz (materia fecal) en la extracción/amplificación del DNA.

Para evaluar la posible interferencia de la matriz en el proceso de extracción, se realizó el “spiking” de la materia fecal: se inocularon diferentes bacterias (*E. coli* y *Salmonella*, tanto el cultivo microbiano como su DNA) en distintas concentraciones; se extrajo el DNA total y finalmente se realizó la amplificación por qPCR, con los primers correspondientes.

También se realizó la inoculación de DNA de cultivos puros en muestras de DNA extraído de materia fecal, a fin de evaluar la presencia de interferentes propios de la matriz, que podrían quedar junto al DNA eluído.

Fue necesario evaluar diferentes técnicas de extracción con el fin de encontrar la más adecuada para el tipo de muestra: se ensayó con un paso previo de inmersiones sucesivas en nitrógeno líquido, lavados previos con PBS o centrifugación de la muestra antes de pasar el líquido a la columna de separación. Estos pasos extra se realizaron, junto al kit de extracción, a partir de muestras de materia fecal, materia fecal inoculada con DNA bacteriano y materia fecal inoculada con cultivo microbiano.

A partir del trabajo realizado en este inciso se concluyó que para determinar la presencia de *E coli* en las muestras, debe evaluarse el DNA en concentración directa (sin diluciones); pero para el caso de *Salmonella*, la muestra se evalúa en concentración directa y diluida (dilución 1/200).

5°- Obtención de las curvas estándar del rango dinámico para cada especie a estudiar, a partir de cultivos microbianos puros.

Se realizaron las curvas estándar para el género *Salmonella* y para *E. coli*, las cuales deben repetirse a fin de obtener una recta confiable con varios puntos (mínimo 5). La misma se construye a partir de un cultivo microbiano, del cual se realizan diluciones seriadas en solución fisiológica seguido de la extracción de DNA, utilizando el protocolo correspondiente al kit de extracción. Luego, se realiza la amplificación por qPCR y de acuerdo a los valores de Ct obtenidos, se construye la recta Ct vs log Concentración (UFC/ml), la cual permite determinar la concentración del microorganismo en las muestras.

Respecto al avance del análisis de la presencia de *L. salivarius* CM-CIDCA 1234C y *L. plantarum* CM-CIDCA 1235C, se secuenciaron los amplicones obtenidos, a fin de poder determinar si las amplificaciones fueron específicas o no. Y en base a esos resultados, se evaluó el camino a seguir para su determinación en la materia fecal.

6°- Extracción de DNA de muestras de materia fecal para determinar la concentración de la población microbiana a evaluar.

Se realizó la extracción de las muestras de materia fecal (cuatriplicados por tratamiento) marcadas con una cruz en las siguientes tablas:

1° ensayo <i>in vivo</i> (MARZO-ABRIL 2018)	1° sacrificio (día 21)	2° sacrificio (día 31)	3° sacrificio (día 44)
Grupo 10 ⁵ UFC/ml tricepa			
Grupo 10 ⁷ UFC/ml tricepa	X	X	X
Grupo Control	X	X	X

2° ensayo <i>in vivo</i> (MAYO-JUNIO 2018)	1° sacrificio (día 16)	2° sacrificio (día 31)	3° sacrificio (día 44)
Grupo 10 ⁸ UFC/ml <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114	X	X	X
Grupo 10 ⁵ UFC/ml <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114			
Grupo 10 ⁷ UFC/ml tricepa			
Grupo Control	X	X	X

El DNA obtenido está almacenado a -20°C hasta proceder a determinar la presencia microbiana.

4. Conclusiones Generales

Como conclusión del estudio desarrollado hasta este punto, podríamos afirmar que se seleccionó y verificó la especificidad de los primers utilizados, se puso a punto un protocolo de extracción de DNA a partir de muestras de materia fecal y, finalmente, se realizaron las extracciones de DNA de las muestras seleccionadas.

5. Referencias bibliográficas

- Dorak T 2006 (Ed.) Real Time qPCR. Taylor & Francis, UK, 329 P. ISBN 0–203–96731–3 Master e-book ISBN.
- Huijsdens XW, Linskens RK, Mak M, Meuwissen SGM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM (2002). Quantification of Bacteria Adherent to Gastrointestinal Mucosa by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12): 4423–4427. DOI: 10.1128/JCM.40.12.4423–4427.2002
- Kasturi KN & Drgon T (2017). Real-time PCR method for detection of *Salmonella* spp. in environmental samples. *Applied Environmental Microbiology*. 83:e00644-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00644-17>.
- Rinttila, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogus, L, Palva, A. (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* ,97: 1166–1177.
- Fu CJ, Carter JN, Li Y, Porter JH, Kerley MS (2006). Comparison of agar plate and real-time PCR on enumeration of *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* and total anaerobic bacteria in dog. *Letters in Applied Microbiology* 42: 490–494.

Anexo 3

Constancia de aprobación de los protocolos de utilización de animales expedidos por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas-UNLP



La Plata, 22 de Febrero de 2017

It is hereby certified that the Institutional Animal Care and Use Committee of the Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata dependence, has reviewed the protocol and procedure for the care and use of laboratory animals entitled "Study of probiotic activity of microorganisms of kefir in the breeding of broilers chickens" and submitted by Graciela Liliana De Antoni (Marina Golowczyk as alternative researcher). This Committee has found that the above procedures are in agreement with local guidelines for vertebrate animal welfare as well as with US Public Health Service and/or European Union policy on this matter (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 2010, and/or European Union Directive for Animal Experiments 2010/63/EU).

The above project is approved, effective on the above date.

Protocol Number 010-01-15

Se deja constancia que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata evaluó el protocolo de utilización de animales presentado por Graciela Liliana De Antoni (Marina Golowczyk como responsable alterno), titulado "Estudio de la actividad probiótica de los microorganismos del kefir en la crianza de pollos parrilleros". Este comité considera que el mencionado protocolo se ajusta a las normas éticas de tratamiento humanitario locales e internacionales que deben aplicarse a los animales vertebrados que se utilizan en investigación biomédica y por tanto lo aprueba en el día de la fecha (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 2010, y/o Directivo de la Unión Europea para Experimentos en Animales, 2010/63/EU).

La aprobación del protocolo será vigente desde la fecha antes indicada y por el lapso de cuatro años.

Número de Protocolo: 010-01-15

PROTOCOLO 010-01-15

"Estudio de la actividad probiótica de los microorganismos del kefir en la crianza de pollos parrilleros"

Responsable: Graciela Liliana De Antoni
Responsables Alternos: Marina Golowczyk
Válido hasta 22 de Febrero de 2021




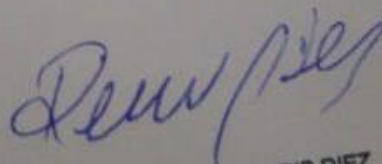
La Plata, 7 de Noviembre de 2019

Se deja constancia de que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata ha recibido el protocolo de utilización de animales presentado por Marina Golowczyc (Graciela De Antoni, como responsable alterno), titulado "Estudio del efecto de cepas probióticas en la crianza de pollos parrilleros frente al desafío con Salmonella serovariedad Gallinarum".

Actualmente se encuentra en evaluación respecto de las normas éticas de tratamiento humanitario locales e internacionales que deben aplicarse a los animales vertebrados que se utilizan en investigación biomédica (Consejo Nacional de Investigaciones, National Academy Press, Washington DC, 2010, y/o Directiva de la Unión Europea para Experimentos en Animales, 2010/63/EU).

Número de Protocolo: 003-00-19

 D. HOZEBOR



Prof. Dr. REINALDO PIS DIEZ
Secretario de Ciencia y Técnica
Facultad de Ciencias Exactas - UNLP

PROTOCOLO 003-00-19

"Estudio del efecto de cepas probióticas en la crianza de pollos parrilleros frente al desafío con Salmonella serovariedad Gallinarum"

Responsable: Marina Golowczyc

Responsable Alterno: Graciela De Antoni

