

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**“DESARROLLO DE UN INÓCULO PROBIÓTICO
PARA POLLOS PARRILLEROS Y MONITOREO
DURANTE SU TRÁNSITO INTESTINAL Y EN
ÓRGANOS DEL MEDIO INTERNO”**

M.V. Jesica Evelyn Blajman

Director: Dr. Laureano Sebastián Frizzo

Co-Director: Dr. Marcelo Raúl Rosmini

**Lugar de realización: Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de
Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet Litoral), UNL-CONICET**

**Departamento de Salud Pública Veterinaria, Facultad de Ciencias
Veterinarias, UNL**

-2017-

A mi familia...

No te rindas, por favor no cedas,
aunque el frío queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se ponga y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños.

Mario Benedetti

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

ARTÍCULOS PUBLICADOS

- 2014. **Blajman, J.E.**, Frizzo, L.S., Zbrun, M.V., Astesana, D.M., Fusari, M.L., Soto, L.P., Rosmini, M.R., Signorini, M.L. Probiotics and broiler growth performance: A meta-analysis of randomized controlled trials. *British Poultry Science*, 55(4): 483-494.
- 2015. **Blajman, J.E.**, Gaziano, C.G., Zbrun, M.V., Soto, L.P., Astesana, D.M., Berisvil, A.P., Romero Scharpen, A., Signorini, M.L., Frizzo, L.S. *In vitro* and *in vivo* screening of native lactic acid bacteria towards their selection as a probiotic in broilers. *Research in Veterinary Science*, 101: 50-56.
- 2015. **Blajman, J.E.**, Zbrun, M.V., Astesana, D.M., Berisvil, A.P., Romero Scharpen, A., Fusari, M.L., Soto, L.P., Signorini, M.L., Rosmini, M.R., Frizzo, L.S. Probióticos en pollos parrilleros: una estrategia para los modelos productivos intensivos. *Revista Argentina de Microbiología*, 47: 360-367.
- 2016. **Blajman, J.E.**, Zbrun, M.V., Signorini, M.L., Zimmermann, J.A., Rossler, E., Berisvil, A.P., Romero Scharpen, A., Astesana, D.M., Soto, L.P., Frizzo, L.S. Development of cecal predominant microbiota in broilers during a complete rearing using denaturing gradient gel electrophoresis. *Animal Production Science*. <http://dx.doi.org/10.1071/AN15475>
- 2016. **Blajman, J.E.**, Astesana, D.M., Zimmermann, J.A., Rossler, E., Romero Scharpen, A., Berisvil, A.P., Zbrun, M.V., Soto, L.P., Rosmini, M.R., Frizzo, L.S. Quantification of FITC-labelling probiotic *Lactobacillus salivarius* DSPV 001P during gastrointestinal transit in broilers. *Beneficial Microbes*. <http://dx.doi.org/10.3920/BM2016.0025>
- 2017. **Blajman, J.E.**, Olivero, C.R., Fusari, M.L., Zimmermann, J.A., Rossler, E., Berisvil, A.P., Romero Scharpen, A., Astesana, D.M., Soto, L.P., Signorini, M.L., Zbrun, M.V., Frizzo, L.S. Impact of lyophilized *L. salivarius* DSPV 001P administration on growth performance, microbial

translocation, and gastrointestinal microbiota of broilers reared under low ambient temperature. Research in Veterinary Science. Enviado.

PRESENTACIONES A CONGRESOS Y JORNADAS

- 2013. **Blajman, J.E.**, Fusari, M.L., Astesana, D.M., Zimmermann, J.A., Conti, G., Zbrun, M.V., Rosmini, M.R., Frizzo, L.S. Evaluación del suero de queso y la leche como medio de crecimiento y conservación de cepas probióticas de origen aviar. XIV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas 2013. Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional de Rosario (FCV-UNR). 27 de agosto de 2013.
- 2013. **Blajman, J.E.**, Astesana, D.M., Fusari, M.L., Gelotti, N., Soto, L.P., Signorini, M.L., Martí, L.E., Frizzo, L.S. Influencia de la suplementación con bacterias ácido lácticas de origen aviar sobre la microbiota intestinal y la translocación bacteriana en pollos parrilleros. XIII Congreso Argentino de Microbiología y II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, 23 al 26 de septiembre de 2013.
- 2013. **Blajman, J.E.**, Fusari, M.L., Conti, G.B., Romero Scharpen, A., Blanche, G.P., Rossler, E., Signorini, M.L., Rosmini, M.R. Growth of lactic acid bacteria of avian origin at low pH and bile. IV Simposio Internacional de Bacterias Lácticas (SIBAL). San Miguel de Tucumán, 16 al 18 de octubre de 2013.
- 2013. **Blajman, J.E.**, Astesana, D.M., Zimmermann, J.A., Berisvil, A.P., Olivero, C.R., Sequeira, G.J., Zbrun, M.V., Frizzo, L.S. Use of fluorescein isothiocyanate to monitor *Lactobacillus salivarius* DSPV 003P during intestinal transit in broilers. IV Simposio Internacional de Bacterias Lácticas (SIBAL). San Miguel de Tucumán, 16 al 18 de octubre de 2013.
- 2013. **Blajman, J.E.**, Gaziano, C.P., Astesana, D.M., Fusari, M.L., Berisvil, A.P., Zimmermann, J.A., Zbrun, M.V., Rosmini, M.R., Frizzo, L.S. Evaluación del crecimiento en leche y determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular de bacterias ácido lácticas de origen aviar. XV Congreso y XXXIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de Rosario (FCA-UNR). 28 y 29 de noviembre de 2013.

- 2014. **Blajman, J.E.**, Fusari, M.L., Astesana, D.M., Berisvil, A.P., Romero Scharpen, A., Conti, G.B., Soto, L.P., Zbrun, M.V., Signorini, M.L., Frizzo, L.S. Monitoreo de *Lactobacillus salivarius* DSPV 001 de origen aviar mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante. XV Jornadas Argentinas de Microbiología. Córdoba, 14 al 16 de agosto de 2014.
- 2014. **Blajman, J.E.**, Fusari, M.L., Astesana, D.M., Berisvil, A.P., Rossler, E., Zimmermann, J.A., Zbrun, M.V., Rosmini, M.R., Frizzo, L.E. Conservación de *Lactobacillus salivarius* DSPV 001P de origen aviar mediante liofilización. XV Jornadas de Veterinarias-Universidad Divulgación Técnico Científicas 2014. Facultad de Ciencias Nacional de Rosario (FCV-UNR). 10 de septiembre de 2014.
- 2014. **Blajman, J.E.**, Fusari, M.L., Romero Scharpen, A., Zimmermann, J.A., Blanco, M., Malmierca, M., Sequeira G., Frizzo, L.S. Colonización de la cepa *Lactobacillus salivarius* DSPV 001P en el tracto gastrointestinal de pollos parrilleros. XVI Congreso y XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 4 y 5 de diciembre de 2014.
- 2015. **Blajman, J.E.**, Berisvil, A.P., Conti, G.B., Astesana, D.M., Romero Scharpen, A., Rossler, E., Soto, L.P., Martí., L.E., Frizzo, L.S. Análisis de la microbiota del ciego de pollos parrilleros suplementados con probióticos por DGGE. XVI Jornadas Argentinas de Microbiología y III Congreso Bioquímico del Litoral. Santa Fe, 5 al 7 de agosto de 2015.
- 2015. **Blajman, J.E.**, Berisvil, A.P., Romero Scharpen, A., Astesana, D.M., Conti, G., Zimmermann, J.A., Rosmini, M.R., Zbrun, M.V., Sequeira, G.J., Frizzo, L.S. Monitoreo de la cepa *Lactobacillus salivarius* DSPV 001P de origen aviar por electroforesis en gel por campos pulsados. XVI Jornadas de Divulgación Técnico Científicas 2015. Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional de Rosario (FCV-UNR). 16 de septiembre de 2015.
- 2015. **Blajman, J.E.**, Romero Scharpen, A., Astesana, D.M., Zimmermann, J.A., Rossler, E., Berisvil, A.P., Fusari, M.L., Rosmini, M.L., Zbrun, M.V., Soto, L.P., Frizzo, L.S. Monitoreo de la cepa

Lactobacillus salivarius DSPV 001P mediante tinción con isotiocianato de fluoresceína. III Jornada de Difusión de la Investigación y Extensión de la Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional del Litoral (FCV-UNL). 10 de noviembre de 2015.

- 2016. **Blajman, J.E.**, Olivero, C.R., Fusari, M.L., Rossler, E., Rossi, L., Sequeira, G.J., Signorini, M.L., Frizzo, L.S. Quantification of FITC-labelled probiotic *Lactobacillus salivarius* DSPV 001P during gastrointestinal transit in broilers. V Simposio Internacional de Bacterias Lácticas (SIBAL). San Miguel de Tucumán, 19 al 21 de octubre de 2016.

RESÚMENES PUBLICADOS EN REVISTAS CON REFERATO

- 2013. **Blajman, J.E.**, Gaziano, C.P., Astesana, D.M., Fusari, M.L., Berisvil, A.P., Zimmermann, J.A., Zbrun, M.V., Rosmini, M.R., Frizzo, L.S. Growth in milk with additives and determination of cell surface hydrophobicity of lactic acid bacteria of avian origin. Revista Biocell. 37 (3), A157.
- 2014. **Blajman, J.E.**, Fusari, M.L., Romero Scharpen, A., Zimmermann, J.A., Blanco, M., Malmierca, M., Sequeira, G., Frizzo, L.S. Colonization of *Lactobacillus salivarius* DSPV 001P in the gastrointestinal tract of broilers. Revista Biocell. 38(5), A83.

AGRADECIMIENTOS

Durante estos años son muchas las personas e instituciones que han participado en este trabajo, y a quienes quiero expresar mi reconocimiento y gratitud.

A las autoridades de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por haber hecho posible la realización de mis estudios de posgrado.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias y al Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, por haber proporcionado el lugar físico para el desarrollo de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por premiarme con una beca y posibilitar mi formación académico-profesional.

A mi director Dr. Laureano Frizzo, por tener siempre la puerta abierta para resolver dudas, por su apoyo constante y la gran confianza depositada en mí, y también por animarme y alentarme en cada una de las fases de la investigación.

A mi Co-Director Dr. Marcelo Rosmini, y a los profesores MSc. Enrique Martí y Dr. Gabriel Sequeira, por ofrecerme sus inestimables conocimientos y experiencia profesional.

A mi consejero estudiantil Dr. Sergio Pasteris, por aceptar cumplir su rol y desempeñarlo con excelencia.

Al Dr. Marcelo Signorini, Dra. Lorena Soto y Dra. Ma. Virginia Zbrun, por haber trabajado conmigo todo el tiempo necesario con una entrega y dedicación absoluta. Empezar, persistir y finalizar una tesis doctoral, no habría sido posible sin sus valiosos aportes.

A Anita, Aye, Beto, Caro, Colo, Diego, Euge, Guille, Lara, Maqui y Pitu, con quienes he compartido incontables horas de trabajo. Gracias por haber sido mis confidentes en los malos momentos, y compartir alegremente los buenos. Más que compañeros de trabajo, siempre los consideraré mis amigos.

A Guille por estar conmigo en cada paso que doy. Seguimos caminando juntos amor!

A mis perros Zoe, Charo y Noah por hacerme inmensamente feliz.

A mi mamá por brindarme su cariño y apoyo incondicional, a mi papá por enseñarme a tomar las decisiones desde mis esperanzas y no desde mis miedos, y a mi hermana por haber sido siempre mi consejera y gran amiga...por ustedes y para ustedes!

A todos los que ocupan un lugar especial en mi vida, a aquellas personas que han estado presentes en mi camino, y han contribuido desinteresadamente para que, como digo siempre, hoy pueda ver la luz al final del túnel. A todos mi eterno agradecimiento.

ÍNDICE GENERAL

TÍTULO	Página
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	I
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE GENERAL	VII
ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS	XIII
ÍNDICE DE TABLAS	XVII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIX
RESUMEN	XXIII
SUMMARY	XXV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Producción de carne aviar en la actualidad	2
1.2. El papel de la microbiota intestinal en la salud y el rendimiento productivo de los pollos parrilleros	4
1.3. Pasado y presente de los probióticos	5
1.4. Requisitos de los probióticos	7
1.5. Mecanismos de acción de los probióticos	7
1.6. Uso de probióticos como promotores de crecimiento	11
1.7. Métodos de administración de probióticos	12
1.8. Monitoreo de los probióticos	14
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
2.1 Hipótesis	17
2.2 Objetivo general	17

2.3 Objetivos específicos	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 Microorganismos	19
3.2 Evaluación de la leche como medio de crecimiento de cepas probióticas aviares	19
3.3 Influencia de la suplementación con BAL de origen aviar sobre la microbiota intestinal y la translocación bacteriana en pollos parrilleros	20
3.3.1 Animales e instalaciones	20
3.3.2 Microorganismos y obtención de mutantes resistentes a rifampicina	21
3.3.3 Preparación y administración de los microorganismos	21
3.3.4 Diseño del experimento	21
3.3.5 Necropsias	22
3.3.6 Pruebas microbiológicas	22
3.3.7 Prueba de translocación	22
3.3.8 Análisis estadístico	23
3.4 Influencia de la cepa <i>L. salivarius</i> DSPV 001P en cultivo fresco sobre la microbiota intestinal, la translocación bacteriana, la ganancia de peso y el índice de conversión de pollos parrilleros	23
3.4.1 Animales e instalaciones	23
3.4.2 Microorganismos	25
3.4.3 Preparación y administración del inóculo	25
3.4.4 Diseño del experimento	26

3.4.5 Normas de bioseguridad	26
3.4.6 Necropsias	27
3.4.7 Recuperación del inóculo	27
3.4.8 Prueba de translocación	27
3.4.9 Análisis estadístico	28
3.5 Conservación de <i>L. salivarius</i> DSPV 001P de origen aviar mediante liofilización	28
3.6 Colonización de la cepa <i>L. salivarius</i> DSPV 001P liofilizada en el TGI de pollos parrilleros	29
3.7 Monitoreo de <i>L. salivarius</i> DSPV 001P mediante electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE)	30
3.7.1 Preparación del ADN genómico	31
3.7.2 Digestión del ADN genómico	32
3.7.3 Electroforesis en campos pulsados	32
3.7.4 Análisis de los patrones de PFGE	33
3.8 Análisis de la dinámica poblacional de la microbiota predominante del ciego de pollos parrilleros	33
3.8.1 Extracción de ADN de las muestras de ciego	34
3.8.2 Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	36
3.8.3 Preparación de los geles, electroforesis y tinción	38
3.8.4 Reactivos para DGGE	40
3.8.5 Identificación y sección de bandas desde un gel de DGGE	41

3.8.6 Purificación y secuenciación de los productos de PCR	41
3.8.7 Análisis de los componentes mayoritarios de la microbiota	42
3.9 Influencia de la cepa <i>L. salivarius</i> DSPV 001P liofilizada sobre la microbiota intestinal, la translocación bacteriana, la ganancia de peso y el índice de conversión de pollos parrilleros	42
3.9.1 Animales e instalaciones	42
3.9.2 Microorganismos	42
3.9.3 Preparación y administración del inóculo	43
3.9.4 Diseño del experimento	43
3.9.5 Normas de bioseguridad	44
3.9.6 Necropsias	44
3.9.7 Recuperación del inóculo	44
3.9.8 Prueba de translocación	45
3.9.9 Aislamiento de <i>Campylobacter</i> termotolerantes	45
3.9.10 Análisis estadístico	46
3.10 Monitoreo de la cepa <i>L. salivarius</i> DSPV 001P mediante tinción con isotiocianato de fluoresceína	46
3.10.1 Preparación de las bacterias fluorescentes	46
3.10.2 Diseño del experimento	46
3.10.3 Necropsias	47
3.10.4 Pruebas microbiológicas	47
3.10.5 Análisis estadístico	47

3.10.6 Cuantificación de fluorescencia en tejidos y contenido gastrointestinal	47
3.10.7 Prueba de translocación	48
3.10.8 Detección de bacterias marcadas fluorescentes en cortes histológicos	48
4. RESULTADOS	50
4.1 Evaluación de la leche como medio de crecimiento de cepas probióticas aviares	51
4.2 Influencia de la suplementación con BAL de origen aviar sobre la microbiota intestinal y la translocación bacteriana en pollos parrilleros	51
4.3 Influencia de la cepa <i>L. salivarius</i> DSPV 001P sobre la microbiota intestinal, la translocación bacteriana, la ganancia de peso y el índice de conversión de pollos parrilleros	55
4.4 Conservación de <i>L. salivarius</i> DSPV 001P de origen aviar mediante liofilización	58
4.5 Colonización de la cepa <i>L. salivarius</i> DSPV 001P liofilizada en el TGI de pollos parrilleros	59
4.6 Monitoreo de las cepas recuperadas desde el TGI mediante electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE)	61
4.7 Análisis de la dinámica poblacional de la microbiota predominante del ciego de pollos parrilleros	61
4.8 Influencia de la cepa <i>L. salivarius</i> DSPV 001P liofilizada sobre la microbiota intestinal, la translocación bacteriana, la ganancia de peso y el índice de conversión de pollos parrilleros	67
4.9 Monitoreo de la cepa <i>L. salivarius</i> DSPV 001P mediante	70

tinción con FITC	
4.9.1 Pruebas microbiológicas	70
4.9.2 Cuantificación de fluorescencia en tejidos y contenido gastrointestinal	71
4.9.3 Detección de bacterias marcadas fluorescentes en cortes histológicos	74
5. DISCUSIÓN	80
5.1 Medios de crecimiento de cepas probióticas aviares y liofilización como método de conservación	81
5.2 Influencia de la cepa <i>L. salivarius</i> DSPV 001P sobre la microbiota intestinal, la translocación bacteriana, la ganancia de peso y el índice de conversión de pollos parrilleros	82
5.3 Análisis de la dinámica poblacional de la microbiota del ciego de pollos parrilleros	87
5.4 Monitoreo de la cepa <i>L. salivarius</i> DSPV 001P mediante tinción con FITC	90
6. CONCLUSIONES	94
7. BIBLIOGRAFÍA	97

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS*

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BLAST	Del inglés “Basic Local Alignment Search Tool”
CHEF	Del inglés “Clamped Homogeneous Electric Field electrophoresis”
CO ₂	Dióxido de carbono
col.	Colaboradores
d	Día
DGGE	Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante
dNTP	deoxi-Nucleótidos Trifosfato
DO	Densidad Óptica
DS	Desvío estándar
DSPV	Departamento de Salud Pública Veterinaria
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
FCV	Facultad de Ciencias Veterinarias
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
<i>g</i>	Unidad de fuerza centrífuga relativa
GFP	Del inglés “Green Fluorescent Protein”
GRAS	Del inglés “Generally Recognized As Safe”
G-C	Grupo control
G-P	Grupo probiótico

H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₂ O _d	Agua destilada
hab	Habitante
HyL	Medio Hongos y Levaduras
IgA	Inmunoglobulina A
Kpb	Kilo pares de bases
Log	Logaritmos decimales
mbar	Milibar
mCCDA	Medio Agar modificado con carbón vegetal, cefoperazona y deoxicolate
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mpb	Un millón de pares de bases
MRS	Medio de Man, Rogosa y Sharpe
MRS _{rif}	MRS suplementado con rifampicina
Na Cl	Cloruro de sodio
NCBI	Del inglés "National Center for Biotechnology Information"
NMR	Nivel Mínimo Recomendado
N ₂	Nitrógeno
O ₂	Oxígeno
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

PFGE	Electroforesis en Gel por Campos Pulsados
pH	Potencial de hidrógeno
p/v	Peso en volumen
RNAsa	Ribonucleasa
rpm	Revolución por minuto
R ²	Coefficiente de determinación
sp.	Especie
spp.	Especies
TBE	Tris-Borato-EDTA
TBX	Medio Triptona-Bilis-X-Glucurónido
TE	Tris-EDTA
TGI	Tracto gastrointestinal
TLR	Receptores Tipo Toll
U	Unidad de actividad enzimática
UFC	Unidad Formadora de Colonias
UFR	Unidades de Fluorescencia Relativa
UNL	Universidad Nacional del Litoral
UPGMA	Ligamiento promedio no ponderado
UV	Ultravioleta
VRBL	Medio Violeta rojo y bilis lactosa para coliformes
VRBG	Medio Violeta rojo y bilis glucosa para enterobacterias
vs.	Versus
v/v	Volumen en volumen

* No se incorporaron las utilizadas por el Sistema Internacional de Unidades (SI).

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	Página
Tabla 1	Producción, consumo, exportación e importación mundial de pollos parrilleros en el año 2014.	2
Tabla 2	Composición de los alimentos.	24
Tabla 3	Mezcla utilizada en la reacción de PCR para la amplificación del 16S ADNr.	36
Tabla 4	Primers empleados para la amplificación de ADN de la comunidad de bacterias presentes en el ciego de pollos parrilleros.	37
Tabla 5	Solución Stock de Mix para PCR.	37
Tabla 6	Condiciones utilizadas para amplificar el ADNr 16S utilizando los primers GC-HDA1 y HDA2.	37
Tabla 7	Tampón TAE 50X.	40
Tabla 8	Solución stock Bis-Acrilamida (37,5:1) 40 %.	40
Tabla 9	Persulfato de amonio (10 %).	40
Tabla 10	Tampón TAE de corrida 1X.	40
Tabla 11	Gel desnaturalizante (8 %).	41
Tabla 12	Microbiota del buche de pollos parrilleros suplementados con <i>L. salivarius</i> DSPV 001P (G-P) y no suplementados (G-C) durante 6 semanas de experimentación.	56
Tabla 13	Microbiota del ciego de pollos parrilleros suplementados con <i>L. salivarius</i> DSPV 001P (G-P) y no suplementados (G-C) durante 6 semanas de experimentación.	56
Tabla 14	Performance de crecimiento en pollos parrilleros suplementados con <i>L. salivarius</i> DSPV 001P (G-P) y no	57

suplementados (G-C) durante 6 semanas de experimentación.

Tabla 15	Porcentaje (%) de identidad de secuencias parciales de 16S ADNr con secuencias presentes en la base de datos del NCBI.	64
Tabla 16	Microbiota del buche de pollos parrilleros suplementados con <i>L. salivarius</i> DSPV 001P (G-P) y no suplementados (G-C) durante 6 semanas de experimentación.	67
Tabla 17	Microbiota del ciego de pollos parrilleros suplementados con <i>L. salivarius</i> DSPV 001P (G-P) y no suplementados (G-C) durante 6 semanas de experimentación.	68
Tabla 18	Peso de pollos parrilleros suplementados con <i>L. salivarius</i> DSPV 001P (G-P) y no suplementados (G-C) durante 6 semanas de experimentación.	69

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	Página
Figura 1	Mecanismos de acción de los probióticos frente a la presencia de patógenos a nivel intestinal.	9
Figura 2	Esquema de la distribución de electrodos en el sistema CHEF de electroforesis en campo pulsado. El ángulo señalado (120°) es el de reorientación entre el campo eléctrico A y el B.	30
Figura 3	Fragmentos de ADN con diferentes secuencias nucleotídicas separados por DGGE.	34
Figura 4	Secuencia experimental en la preparación y electroforesis de geles de DGGE.	39
Figura 5	Recuperación de las cepas <i>L. salivarius</i> DSPV 001P, <i>L. salivarius</i> DSPV 003P y <i>L. agilis</i> DSPV 004P desde el ciego de los pollos tratados 24 h post administración.	52
Figura 6	Recuperación de las cepas <i>L. salivarius</i> DSPV 001P, <i>L. salivarius</i> DSPV 003P y <i>L. agilis</i> DSPV 004P desde el buche de los pollos tratados 24 h post administración.	52
Figura 7	Recuento de enterobacterias procedentes del ciego de pollos tratados y controles.	53
Figura 8	Recuento de enterobacterias procedentes del buche de pollos tratados y controles.	54
Figura 9	Recuento de coliformes desde el ciego de pollos tratados y controles.	54
Figura 10	Recuento de coliformes desde el buche de pollos tratados y controles.	55
Figura 11	Viabilidad durante 12 semanas de la cepa <i>L. salivarius</i> DSPV 001P en temperatura ambiente, refrigeración y	59

congelación.

- Figura 12 Recuperación de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P desde el ciego de pollos parrilleros suplementados durante 16 d. 60
- Figura 13 Recuperación de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P desde el buche de pollos parrilleros suplementados durante 16 d. 60
- Figura 14 Perfiles electroforéticos obtenidos por PFGE de las cepas (1) *L. salivarius* DSPV 001P wildtype, (2) *L. salivarius* DSPV 001P resistente al antibiótico rifampicina, (3) *L. salivarius* DSPV 001P liofilizada, (4) *L. salivarius* DSPV 001P recuperada de buche y (5) *L. salivarius* DSPV 001P recuperada de ciego. La restricción del ADN genómico se realizó empleando la enzima SmaI. El marcador de peso molecular utilizado fue Lambda Ladder PFGE Marker (New England Biolabs, Ipswich, Estados Unidos). 61
- Figura 15 DGGE de ADN extraído del ciego de pollos tratados durante 16 d con la cepa *L. salivarius* DSPV 001P. (A) día 1, (B) día 15, (C) día 30, (D) día 45, (P) patrón con bacterias de referencia (de arriba a abajo del gel: *E. faecium* DSPV 22T, *L. salivarius* DSPV 001, *C. jejuni* C173 y *S. enteritidis* 421). 62
- Figura 16 Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana del ciego de los pollos tratados durante 16 d con la cepa *L. salivarius* DSPV 001P. 64
- Figura 17 Recuperación de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P en el TGI de pollos parrilleros. 71
- Figura 18 Correlación entre recuentos microbiológicos vs. fluorescencia. (a) Mucosa del buche luego de 30 min 72

de la administración de *L. salivarius* DSPV 001P marcada con FITC; (b) Contenido de buche luego de 30 min de la administración de *L. salivarius* DSPV 001P marcada con FITC; (c) Duodeno luego de 30 min de la administración de *L. salivarius* DSPV 001P marcada con FITC; (d) Ciego luego de 6 h de la administración de *L. salivarius* DSPV 001P marcada con FITC; (e) Ciego luego de 12 h de la administración de *L. salivarius* DSPV 001P marcada con FITC.

- Figura 19 Recuento de *L. salivarius* DSPV 001P (Log UFC / 0,1 g) a distintos tiempos y en diferentes órganos. Los valores observados de la técnica de recuento en placa se indican con líneas continuas, mientras que los valores calculados con la ecuación obtenida por el modelo logarítmico se indican mediante círculos. 73
- Figura 20 Interacción con el buche de *L. salivarius* DSPV 001P marcadas con FITC. (a, b) Fluorescencia en buche luego de 30 min de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (c, d) Fluorescencia en buche luego de 6 h de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (e, f) Fluorescencia en buche luego de 12 h de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (g, h) Buche de pollos controles (ausencia de bacterias marcadas fluorescentes). Aumento 400X. 75
- Figura 21 Interacción con el duodeno de *L. salivarius* DSPV 001P marcadas con FITC. (a, b) Fluorescencia en duodeno luego de 30 min de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (c, d) Fluorescencia en duodeno luego de 6 h de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (e, f) Fluorescencia en duodeno luego de 12 h de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P. 76

salivarius DSPV 001P; (g, h) Duodeno de pollos controles (ausencia de bacterias marcadas fluorescentes). Aumento 400X.

- Figura 22 Interacción con el ciego de *L. salivarius* DSPV 001P marcadas con FITC. (a, b) Fluorescencia en ciego luego de 30 min de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (c, d) Fluorescencia en ciego luego de 6 h de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (e, f) Fluorescencia en ciego luego de 12 h de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (g, h) Ciego de pollos controles (ausencia de bacterias marcadas fluorescentes). Aumento 400X. 77
- Figura 23 Interacción con la bolsa de Fabricio de *L. salivarius* DSPV 001P marcadas con FITC. (a) Fluorescencia en bolsa de Fabricio luego de 30 min de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P (ausencia de bacterias marcadas fluorescentes); (b) Fluorescencia en bolsa de Fabricio luego de 6 h de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (c) Fluorescencia en bolsa de Fabricio luego de 12 h de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (d) bolsa de Fabricio de pollos controles (ausencia de bacterias marcadas fluorescentes). Aumento 400X. 78
- Figura 24 (a, b, c) Fluorescencia en hígado luego de la administración de *L. salivarius* DSPV 001P marcadas con FITC (ausencia de bacterias marcadas fluorescentes). Aumento 400X. 78

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un inóculo de bacterias ácido lácticas (BAL) indígenas con capacidad probiótica capaz de mejorar el estado sanitario y la performance de pollos parrilleros durante una crianza completa, y establecer un método de monitoreo del probiótico una vez administrado a los animales.

A partir de los aislamientos de microorganismos indígenas del tracto gastrointestinal (TGI) de pollos parrilleros realizados en el Departamento de Salud Pública Veterinaria (DSPV), tres cepas de BAL fueron elegidas para el estudio de las propiedades tecnológicas y propiedades probióticas *in vivo*. *Lactobacillus salivarius* DSPV 001P, *L. salivarius* DSPV 003P y *L. agilis* DSPV 004P fueron propagadas en leche descremada y administradas en un ensayo *in vivo* para evaluar la influencia sobre la microbiota, la translocación al medio interno y la capacidad de colonización gastrointestinal. Las cepas utilizadas fueron capaces de superar las barreras biológicas, alojarse y permanecer en el TGI sin translocar al medio interno. Luego de la administración, no se encontraron diferencias significativas en el recuento de enterobacterias y coliformes entre los grupos. La colonización de ciego y buche fue significativamente mayor para *L. salivarius* DSPV 001P, por lo que esta cepa fue seleccionada como el mejor exponente para ensayos posteriores. De esta manera, la cepa se administró en cultivo fresco para estimar el efecto sobre los parámetros productivos de los pollos parrilleros. En lo que respecta a ganancia de peso, consumo y eficiencia de conversión alimenticia, no hubo diferencias significativas entre el grupo tratado y control.

En un estudio subsiguiente, se evaluó la conservación mediante el proceso de liofilización de la cepa anteriormente descrita a diferentes condiciones medio-ambientales durante 12 semanas (temperatura ambiente a 25 °C y 4 °C) y durante 12 meses (-20 °C). La viabilidad de la cepa no fue afectada por el proceso de liofilización, y varió según las temperaturas evaluadas. La metodología de conservación por congelación resultó ser la más adecuada para administrar la cepa en condiciones de granja, debido a que fue posible mantener la viabilidad celular por encima de 8 Log UFC/g durante 12 meses.

En una etapa posterior, se procedió a estimar la colonización y persistencia *in vivo* de la cepa liofilizada, para lo cual la misma fue suministrada con la dieta a los pollos durante 16 d: se obtuvo un alto grado de recuperación de la cepa probiótica en buche y ciego, y la misma pudo recuperarse durante 28 d luego del cese de la suplementación. Finalmente, se estudió la influencia de la cepa liofilizada sobre la microbiota intestinal, la translocación bacteriana, la ganancia de peso y el índice de conversión de pollos parrilleros. En cuanto a la microbiota, se hallaron diferencias significativas en el número de levaduras en ciego a favor del grupo control. La cepa estimuló el consumo y mejoró significativamente la ganancia de peso en los pollos parrilleros. Además, contribuyó positivamente en el estado sanitario al disminuir la mortandad de los mismos. Esto tiene una fuerte relevancia en los costos de producción, y justificaría el empleo de *L. salivarius* DSPV 001P durante la crianza de pollos parrilleros.

El destino de la cepa probiótica pudo ser monitoreado mediante diferentes métodos. La obtención de mutantes resistentes a rifampicina, permitió rastrear a la cepa en diferentes secciones del TGI de pollos parrilleros. A través de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) y posterior secuenciación, se confirmó la presencia de *L. salivarius* sólo en pollos parrilleros de 45 d de edad. La electroforesis en gel por campos pulsados (PGFE) fue empleada para comprobar si la cepa administrada presentaba diferencias con la recuperada desde el TGI, observándose una similitud del 100 % entre la cepa administrada y la recuperada. Por último, la tinción con isotiocianato de fluoresceína (FITC), permitió estimar el recuento bacteriano en buche y duodeno 30 min después de la suplementación, y en ciego 6 y 12 h después de la administración de *L. salivarius* DSPV 001P.

Todo lo expuesto anteriormente demuestra que la cepa probiótica *L. salivarius* DSPV 001P podría ser incorporada en la dieta de pollos parrilleros de manera estratégica para mejorar las condiciones sanitarias y de producción de las explotaciones intensivas.

Palabras clave: bacterias ácido lácticas - probióticos - monitoreo - pollos parrilleros

SUMMARY

The aim of this research was to develop an inoculum of indigenous lactic acid bacteria (LAB) with probiotic capacity to improve performance and health parameters of broilers during a complete rearing, and establish a method for monitoring the probiotic after administering to animals.

Numerous isolates of indigenous microorganisms from the gastrointestinal tract of broilers (GIT) were investigated, and three LAB strains were selected for the study of technological and *in vivo* probiotic properties. *L. salivarius* DSPV 001P, *L. salivarius* DSPV 003P, and *L. agilis* DSPV 004P were propagated in skim milk and given to broilers to determine influence on microbiota, intestinal tract colonization by inoculated bacteria, and translocation in the internal environment. The strains used were able to overcome biological barriers and were recovered from broilers' samples. Bacterial translocation to the internal medium was not found. No significant differences in *Enterobacteriaceae* and coliforms concentrations were observed among the groups. Total cell counts of *L. salivarius* DSPV 001P were significantly higher in comparison with the other strains. Therefore, fresh cultures of *L. salivarius* DSPV 001P were administered to estimate the impact on growth performance of broilers. With regard to weight gain, consumption and feed conversion efficiency, no statistical differences were observed between treatments.

In a subsequent study, lyophilized *L. salivarius* DSPV 001P viability was assessed. The strain was lyophilized and kept at different environmental conditions for 12 weeks (25 °C and 4 °C) and for 12 months (-20 °C). Lyophilization did not reduce strain viability, and it was different according to the evaluated temperatures. Preservation at -20 °C was the most suitable method for maintaining cell viability above 8 log CFU / g for 12 months. Then, we estimate *in vivo* colonization and persistence of the lyophilized strain. *L. salivarius* DSPV 001P was administered to the diet during 16 d and it could be recovered from crop and caecum 28 days following cessation of feeding.

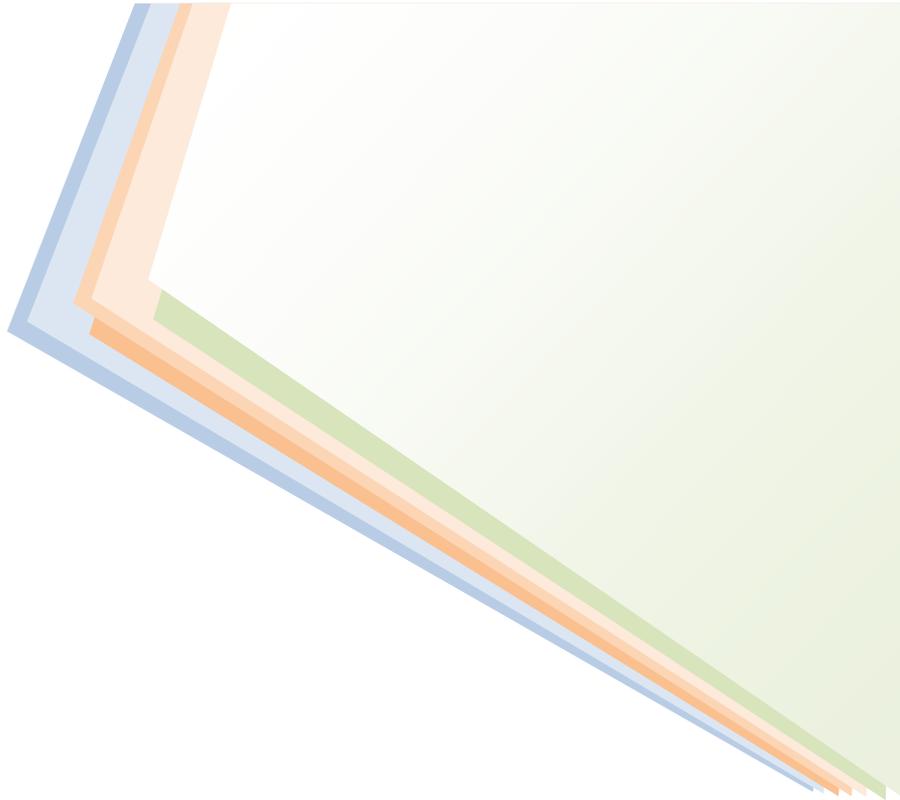
Finally, the influence of the lyophilized strain on intestinal microbiota, bacterial translocation, and performance parameters of broilers was studied. The number of yeast was higher in the caecum of the control group. Furthermore, the strain

stimulated consumption and significantly improved weight gain in broilers. It also contributed positively in the health status by reducing mortality. It has a strong relevance in production costs, and justify the use of *L. salivarius* DSPV 001P in broilers' production.

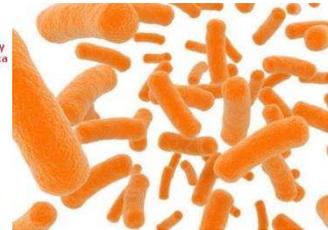
The fate of the probiotic strain could be monitored by different methods. Rifampicin marking to recover *L. salivarius* DSPV 001P allowed us to trace down the inoculum in different sections of the GIT. Through denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and subsequent sequencing, the presence of *L. salivarius* in broilers was confirmed at 45 d of age. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was an appropriate tool to confirm that the strain used was always the same strain, showing a 100% similarity between the administered strain and the recovered strain. Finally, fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelling technique could be used as an indicator of fluorescent probiotic bacteria in the crop and duodenum 30 min after probiotic bacterium supplementation. In addition, the fluorescent signal could be use to estimate bacterial counts in caecum 6 and 12 h after *L. salivarius* DSPV 001P administration.

Based upon this information, the probiotic strain *L. salivarius* DSPV 001P could be strategically incorporated into the diet to improve health and performance parameters of broilers raised under intensive conditions.

Keywords: lactic acid bacteria - probiotics - monitoring - broilers



1. INTRODUCCIÓN



1.1. Producción de carne aviar en la actualidad

De acuerdo a cifras aportadas por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (2014), en los últimos años en Argentina se ha incrementado notablemente el consumo de carne de ave y la ingesta anual promedio se ha estimado en 40,39 kg/habitante en 2014, en relación a 39,66 kg/hab en 2013.

Tabla 1. Producción, consumo, exportación e importación mundial de pollos parrilleros en el año 2014.

Países 2014	Producción (millones de T)	Consumo (millones de T) Kg/hab/año	Exportaciones (millones de T)	Importaciones (millones de T)
EEUU	16,96	13,66	3,35	0,05
China	13,50	13,35	0,42	0,26
Brasil	12,77	9,19	3,58	
UE	9,75	9,33	1,10	0,67
México	3,00	3,67		0,68
India	3,42	3,42		
Rusia	3,05	3,53		0,54
Tailandia	1,50		0,54	
Argentina	1,93	1,68 40,39	0,32	0,01
Turquía	1,76		0,37	
Indonesia	1,55	1,55		
Japón		2,17		0,86
Sudáfrica		1,76		0,36
Arabia Saudita				0,81
Resto	15,36	19,71	0,32	4,49

Adaptado de

http://www.miniagri.gob.ar/site/ganaderia/renavi/Anuario_Avicola_2014.pdf

En 2014, la producción mundial de carne aviar estimada alcanzó más de 84,5 millones de T, lo que representa un incremento de 1,81 % en comparación con el año 2013 (Tabla 1). Argentina tiene un protagonismo importante en el mercado internacional de carne de ave, en el que ocupa el octavo lugar como productor y el sexto como exportador (Tabla 1) (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2014).

A lo largo de los años, las condiciones de producción aviar han evolucionado y esto ha modificado la capacidad de resistencia natural de los pollos parrilleros. La cría intensiva limita el contacto materno y utiliza nuevos métodos de alimentación y condiciones de hábitat artificiales. Asimismo, la utilización de animales más productivos y el incremento del uso de antibióticos favorecen las condiciones de estrés de las aves, incrementan las deficiencias en la composición de su microbiota intestinal, hacen más frecuentes los desórdenes digestivos y producen una menor resistencia natural a la colonización por microorganismos patógenos (James y col., 1984; Fuller, 1992; Mulder y col., 1997; Burkholder y col., 2008).

Desde su descubrimiento, los antibióticos han representado una herramienta importante para el tratamiento de enfermedades infecciosas en el hombre y en animales. Se han suministrado a los animales de granja (bovinos, ovinos, porcinos y aves) junto con la dieta con un doble propósito: por un lado, prevenir y tratar cuadros bacterianos y, por el otro, favorecer el crecimiento de los animales (Barton, 2000; Sinol Sen y col., 2011). Sin embargo, desde hace algunos años, el uso de antibióticos se ha restringido en ciertos países. Desde 2006, la Unión Europea instauró la total prohibición del uso de antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal (EFSA, 2007). El uso de estos productos en forma indiscriminada produjo la aparición de cepas bacterianas resistentes, proceso que se potenció por la capacidad de las bacterias de transferir dicha resistencia, incluso entre diferentes géneros y especies (Teuber y col., 1996; Saarela y col., 2000; Castanon, 2007; Marshall y col., 2011). Aunque las terapias antibióticas controlan los microorganismos patógenos, también afectan a muchos microorganismos benéficos, lo que origina trastornos en el equilibrio de la microbiota gastrointestinal (Salminen y col., 1998; Torok y col., 2011). Muchos de estos antibióticos o sus residuos

pueden permanecer en los tejidos animales que son destinados al consumo humano. El avance en el conocimiento que el uso de probióticos puede sustituir las terapias con antibióticos brinda una nueva alternativa para el control de brotes epidémicos (Rosmini y col., 2004a; Verna, 2010; Frizzo y col., 2011; Signorini y col., 2011).

1.2. El papel de la microbiota intestinal en la salud y el rendimiento productivo de pollos parrilleros

El intestino delgado del pollo 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 (Londero, 2012). A medida que el animal crece, se establece una comunidad microbiana cada vez más compleja (Van Der Wielen y col., 2002; Rinttilä y Apajalahti, 2013) y cada región desarrolla un perfil microbiano específico (Gong y col., 2008). Cuando los animales se desarrollan en sistemas de producción extensivos o en forma silvestre, el aparato digestivo es colonizado espontáneamente por la microbiota del medioambiente y se genera una simbiosis benéfica con el hospedador (Kurzak y col., 1998; Lutful Kabir, 2009). El tracto gastrointestinal (TGI) de los pollos contiene bacterias, hongos y protozoos, siendo las bacterias los microorganismos predominantes (Gabriel y col., 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 y Yu, 2014; Sergeant y col., 2014). Se estima que el TGI de los pollos posee cerca de 10^{13} bacterias y que solo entre el 10 y el 60 % de aquellas han podido ser cultivadas e identificadas por métodos convencionales (Johansen y col., 2006). Las especies predominantes en íleon corresponden al género *Lactobacillus*, en primer lugar, y luego a las familias *Clostridiaceae*, *Streptococcaceae* y *Enterococcaceae*. En contraste, el grupo más abundante detectado en los ciegos es *Clostridiaceae* (Lu y col., 2003a).

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., que pueden desencadenar respuestas

inflamatorias, producir infecciones localizadas o sistémicas, o sintetizar toxinas o compuestos perjudiciales (Londero, 2012). Si consideramos las importantes pérdidas económicas que originan estos agentes patógenos en las explotaciones aviares, es evidente el interés que puede suscitar 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 y Gong, 2011).

1.3. Pasado y presente de los probióticos

El término probiótico significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar microorganismos que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. Los primeros conocimientos con base científica surgieron de los estudios que realizó Metchnikoff, a principios del siglo XX. Este investigador sugirió que la larga vida de los campesinos en Bulgaria era el resultado del consumo de los productos de leche fermentada que contenían cepas de bacterias ácido-lácticas (BAL), algunas de las cuales presentan propiedades probióticas. Sin embargo, dada la masificación del uso de antibióticos, no fue sino hasta la década de los sesenta cuando se intensificó la búsqueda de conocimientos que fundamentaran el efecto benéfico de determinados microorganismos para la salud del hombre y de los animales.

La definición más reciente de probióticos fue propuesta por la *International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics*. Un grupo de expertos convocados por esta entidad publicó un nuevo informe 12 años después del documento de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO, 2002), con el fin de actualizar los conocimientos adquiridos respecto de los probióticos. Estos fueron definidos como “microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio al hospedador” (Hill y col., 2014).

En la actualidad, el uso de probióticos en animales de producción está destinado a mejorar la conversión alimenticia, a promover el crecimiento y a inhibir el desarrollo de bacterias patógenas (Rosmini y col., 2004a; Frizzo y col., 2011; Signorini y col., 2011). Es interesante destacar que, aun cuando solo existe una vasta experiencia en el empleo de probióticos en aves y mamíferos,

su utilización se ha propagado a otras especies. El empleo de BAL en abejas se hace posible puesto que se ha señalado su presencia como responsable de los cambios metabólicos y procesos fermentativos que permiten la preservación del pan de abeja. Este pan de abeja es el alimento que las abejas nodrizas dan a las larvas en el cuadro de cría. Si se añaden BAL que hayan sido seleccionadas según algún criterio determinado, por ejemplo, inhibición de algún microorganismo patógeno mediante la reducción de pH o la producción de sustancias tipo bacteriocinas, se estaría colaborando con la presencia de estos agentes en el alimento que recibirá la cría (Audisio y col., 2012). En los últimos años, se han multiplicado los estudios referidos al uso de cultivos probióticos en acuicultura, utilizando microorganismos aislados del ambiente acuático. Se ha indicado no solo su efecto como agentes de control biológico de enfermedades, sino también como promotores de crecimiento, logrando así organismos más sanos y con tallas adecuadas para su comercialización en menor tiempo (Vázquez y col., 2005; Balcázar y col., 2007; Lara-Flores y col., 2010; Lauzon y col., 2014).

En lo que respecta a animales de granja, Frizzo y col. (2011) administraron a terneros lactantes un inóculo probiótico formado por una suspensión de 3 microorganismos. El inóculo utilizado produjo una evolución positiva de los pesos de los terneros criados “en estaca”. En tanto, Ross y col. (2012) demostraron que la administración de probióticos a cerdos en fase de cría mejoraba el perfil lipídico de la carne. Por otra parte, Tellez y col. (2001) evaluaron el efecto protector en pollos parrilleros de un suplemento probiótico frente a un desafío con *Salmonella* sp. La administración preventiva de este suplemento probiótico permitió la disminución de la colonización de hígado, bazo y ciego en los pollos tratados. Ghareeb y col. (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 probiótico redujo significativamente la colonización cecal por *C. jejuni* 8 y 15 d después del desafío. Asimismo, Cao y col. (2012) efectuaron un desafío frente a *Clostridium perfringens* y demostraron que *L. fermentum* 1.2029 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, cambiando los niveles de expresión de citocinas y receptores tipo Toll (TLR).

1.4. Requisitos de los probióticos

Aunque está instaurado el concepto de reemplazar las bacterias patógenas del intestino con bacterias benéficas, aún persisten dudas sobre la eficacia de los probióticos disponibles, muchas de ellas derivadas de experiencias sin éxito con este tipo de productos, ya que algunos no dieron los resultados esperados (Willis y Reid, 2008; Bitterncourt y col., 2011). La variabilidad en los resultados puede deberse a que los probióticos proceden de otras regiones geográficas o incluso de otras especies animales, a las cepas usadas, a las dosis, a la composición de la dieta, a las estrategias de alimentación y a la interacción con otros aditivos alimenticios en la ración diaria (Chesson, 2005; Otutumi y col., 2012). A su vez, el comportamiento animal en respuesta a la adición de probióticos está influenciado por múltiples factores, entre los cuales se encuentran la edad, la raza, el tipo de explotación, el uso de antibióticos, el estrés y el ambiente de la crianza, por lo que considerar estos factores es un punto crítico antes de utilizar estos productos (Fox, 1994).

Para que un organismo sea considerado probiótico debe cumplir una serie de requisitos, como contar con su caracterización *in vitro*, lo que implica conocer la estabilidad fenotípica y genotípica y los patrones de utilización de hidratos de carbono y proteínas. Además, se tienen en cuenta la resistencia a la acidez gástrica, la resistencia a la bilis, la adhesión al epitelio intestinal y, opcionalmente, la resistencia a lisozima. Otros factores que se deben considerar son la capacidad de utilizar prebióticos (opcional) y la existencia de ensayos *in vivo* e *in vitro* que demuestren los efectos probióticos adjudicados. Asimismo, deben tener carácter *Generally Regarded as Safe* (GRAS, reconocido como seguro para la salud) y no presentar resistencia a antibióticos ni determinantes de patogenicidad (Tuomola y col., 2001).

1.5. Mecanismos de acción de los probióticos

El efecto benéfico de los probióticos se atribuye en general a mecanismos diferentes, entre ellos los más destacados son:

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 pared intestinal para fijarse exitosamente en el 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 y Burkholder, 2003; Nishiyama y col., 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 y col. (2000) encontraron que *L. johnsonii* La1 posee 2 sitios de unión a hidratos de carbono principales, por lo que podía inhibir la unión de los patógenos a los receptores de manano epiteliales de la mucosa (Figura 1).

B) Producción de sustancias antimicrobianas.

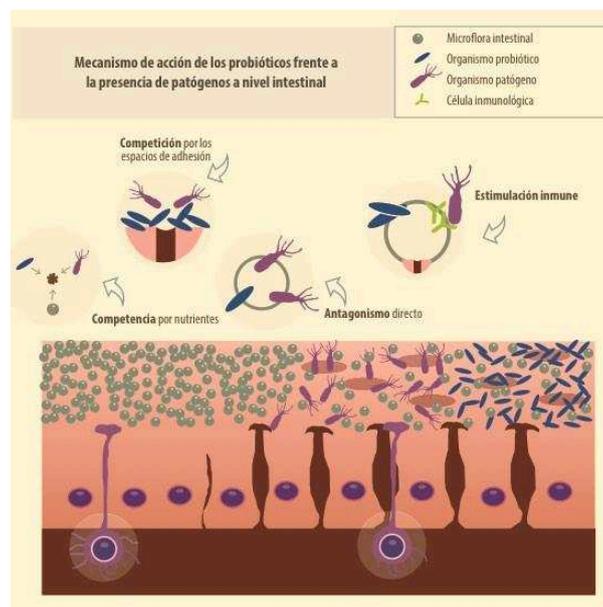
Los efectos inhibitorios de las bacterias probióticas sobre los microorganismos indeseables pueden deberse a la producción de diferentes metabolitos como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), diacetilo, bacteriocinas y ácidos orgánicos. El efecto bactericida del H_2O_2 se atribuye a su potente acción oxidante,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

Las bacteriocinas fueron inicialmente definidas como proteínas de bajo peso molecular biológicamente activas contra miembros de la misma especie o de especies muy relacionadas a la cepa productora (Tagg y col., 1976; Klaenhammer, 1988). Sin embargo este concepto se ha visto modificado, ya que se ha encontrado evidencia experimental de acciones bactericidas frente a cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora (Sablon y col., 2000, Pasteris y col., 2014). Algunas investigaciones señalan que las bacteriocinas ejercen su actividad antimicrobiana provocando daños en la pared celular (Kailasapathy y Chin, 2000). Stern y col. (2008) evaluaron la

producción de bacteriocinas por *L. salivarius* NRRL B-30514 y *Paenibacillus polymyxa* NRRL B-30509 aisladas del ciego de pollos parrilleros. El tratamiento de los animales con dichas bacteriocinas mostró una reducción significativa en la prevalencia de *C. jejuni* en el intestino de pollos. Line y col. (2008) reportaron que el empleo de la bacteriocina E 760 producida por la cepa NRRL B-30745, identificada como *E. durans*, *faecium* o *hiraе* (no existe una identificación exacta) condujo a niveles no detectables de *Campylobacter* spp. cuando se administró en la dieta en una sola dosis 4 días antes del análisis.

Los probióticos pueden, además, producir sustancias antimicrobianas como ácido láctico, acético y propiónico, que acidifican el medio intestinal y, así, 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). Para comprender este principio, debemos recordar que las bacterias enteropatógenas se multiplican y viven en rangos de pH que van de 5,5 a 7,5. Yu y col. (2007) observaron que los pollos inoculados con *L. reuteri* Pg4 tenían una mayor concentración de ácido láctico y un pH más bajo en el ciego que los controles no inoculados. Murry y col. (2004) determinaron que los ácidos grasos producidos por *L. salivarius* y *L. plantarum* como parte de su metabolismo nutricional disminuían el pH del medioambiente intestinal y afectaban de esa manera a la sobrevivencia de bacterias patógenas, como *E. coli*, *S. typhimurium* y *C. perfringens* (Figura 1).

Figura 1. Mecanismos de acción de los probióticos frente a la presencia de patógenos a nivel intestinal.



Adaptado de <http://nutricionanimal.info/probioticos-prebioticos-y-simbioticos-en-nutricion-y-salud-animal/>

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).

No todos los microorganismos probióticos inducen el mismo tipo de efectos sobre la respuesta inmune o sobre los microorganismos presentes en la luz intestinal, ni lo hacen con la misma intensidad. Higgins y col. (2007) indicaron que la administración de un cultivo a base de *Lactobacillus* spp. luego del desafío de pollos parrilleros con *S. enteritidis* redujo significativamente (respecto de los controles) la recuperación de *Salmonella* a partir de las tonsilas cecales 24 h después del tratamiento, probablemente por una estimulación de la respuesta inmune innata.

Se ha demostrado que pollos tratados con probióticos producen mayor cantidad de anticuerpos frente a un determinado antígeno, cumpliendo un importante papel como adyuvantes (Molnár y col., 2011; Hill y col., 2014; Shahir y col., 2014). A modo de ejemplo, los títulos de anticuerpos luego de la vacunación contra el virus de la enfermedad de Newcastle y contra *Eimeria* fueron mayores en pollos que consumieron probióticos que en aquellos que no recibieron el tratamiento (Lee y col., 2011). Otro estudio examinó los efectos de un probiótico a base de *Lactobacillus* spp. sobre la respuesta inmune intestinal de pollos parrilleros en el transcurso de una infección por *Eimeria acervulina* (Dalloul y col., 2005). Los pollos alimentados con probióticos mostraron una reducción en el número de ooquistes producidos después de la administración de una dosis infectiva de *E. acervulina*. El estudio sugiere un impacto positivo de los probióticos en la estimulación de la respuesta inmune temprana contra *E. acervulina* (secreción de interferón e IL 2), lo que resulta en una mejora en la respuesta inmune local (intestinal) contra la coccidiosis (Figura 1).

1.6. Uso de probióticos como promotores de crecimiento

Algunos autores han reportado que los probióticos mejoran los parámetros productivos de las aves (Kabir y col., 2004; Sánchez y col., 2007; Wang y Gu, 2010; Sinol Sen y col., 2011). Sin embargo hay muchas otras investigaciones en las que los probióticos carecen de efectos positivos (ZuAnon y col., 1998; Patidar y Prajapati, 1999; Ergun y col., 2000; Kumprechtova y col., 2000). Los datos de la literatura ofrecen una variedad de resultados dispares en lo referente a la eficacia de los probióticos como promotores de crecimiento.

Jin y col. (2000) estudiaron el efecto de dos probióticos (*L. acidophilus* I26 y una mezcla de 12 lactobacilos) sobre el crecimiento de pollos parrilleros. Los autores comprobaron que la ganancia de peso era superior en los pollos tratados con probióticos respecto al grupo control. Asimismo la eficiencia de conversión alimenticia de los grupos tratados con probióticos mejoró en relación con los controles. Sin embargo, cabe destacar que el uso de 12 cepas de lactobacilos para un tratamiento probiótico puede llegar a ser más costoso que las pérdidas asociadas a la mortalidad natural de los pollos del grupo no tratado. Blajman y col. (2014) analizaron en un metaanálisis los resultados de diferentes investigaciones realizadas con probióticos en pollos parrilleros: los pollos que consumieron probióticos aumentaron en promedio 661 g más a lo largo de una crianza que aquellos que no consumieron probióticos. Asimismo los pollos suplementados con probióticos utilizaron más eficientemente el alimento y necesitaron 281 g menos de alimento por cada kilogramo de peso vivo producido. En este metaanálisis se estimó que el número mínimo de pollos parrilleros requerido en un experimento para identificar diferencias estadísticas entre los grupos en lo referente a ganancia de peso era de 140 aves. Además, se dedujo que la suplementación probiótica mejoraba la ganancia de peso en aquellos estudios que usaban inóculos monocepa y multicepa. Entre los estudios que suministraron probióticos monocepa, el efecto benéfico se vislumbró en los pollos suplementados con *Pediococcus* spp. o *Bacillus* spp., mientras que no se observó luego de la administración de *Lactobacillus* spp. o *Enterococcus* spp. Con la suplementación de *Streptococcus* spp. los animales perdieron peso. Sin embargo, considerando que el número de experimentos que utilizaron un determinado inóculo monocepa fue relativamente pequeño,

con la excepción de *Bacillus* spp., los resultados deben ser interpretados con precaución. En lo que respecta a duración de los experimentos, el análisis de subgrupos indicó efectos positivos similares cuando los mismos eran superiores, iguales o inferiores a 42 d. Por último, teniendo en cuenta el método de administración, el impacto benéfico sobre el peso se mantuvo tanto en aquellos experimentos en los que los probióticos se incluían en el agua de bebida, como así también en los que se incorporaban en el alimento. Aun así, la aplicación a través del agua arrojó mejores resultados.

En tanto, algunos estudios (Gunal y col., 2006; Telg y Caldwell, 2009) no encontraron diferencias significativas en la conversión alimenticia ni en la ganancia de peso de pollos parrilleros por administración de un probiótico comercial. De la misma manera, Daneshmand y col. (2011) reportaron que la inclusión de probióticos disminuyó la ganancia de peso de las aves durante todo el experimento y no tuvo efectos sobre la eficiencia de conversión alimenticia.

1.7. Métodos de administración de probióticos

Los métodos de administración de los probióticos pueden determinar la capacidad de colonización intestinal por las bacterias presentes en el producto empleado y, de esa manera, tienen 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, finalmente, la aplicación en dosis individuales. Algunos estudios indican que la vehiculización de los probióticos en el agua de bebida mejora la productividad (Eckert y col., 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 y col, 2010). Asimismo, la viabilidad de microorganismos anaerobios muestra un rápido descenso, especialmente en agua clorinada, lo que afecta la concentración bacteriana óptima necesaria para ejercer el efecto benéfico deseado en el hospedador (Seuna y col., 1978; Karimi Torshizi y col., 2010). Eckert y col. (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 peletizado no fue tan eficaz como el suministro en el agua. Esto parece obedecer a que las BAL se destruyen en parte o totalmente por las altas temperaturas empleadas durante el proceso de peletización (Ghadban, 2002). En contraposición, Grimes y col. (2008) mejoraron los parámetros productivos y redujeron la colonización intestinal de *S. typhimurium*, *S. kentucky* y *S. heidelberg* en pollos parrilleros mediante la suplementación con *L. acidophilus* y *L. casei* independientemente del proceso de peletización.

Para mejorar la viabilidad microbiana en el alimento se pueden aplicar diferentes técnicas de conservación, entre ellas la encapsulación, que retiene microorganismos dentro de una matriz porosa. Rodklongtan y col. (2014) encapsularon *L. reuteri* KUB-AC5 destinado a pollos parrilleros en una matriz de alginato y quitosano, mezclaron el alimento balanceado con las BAL microencapsuladas, las administraron a los pollos y de ese modo lograron mantener la viabilidad del probiótico durante el paso por el TGI.

La aplicación por aspersión permite tratar a los pollos con rapidez después de la eclosión y asegura una distribución homogénea del probiótico (Londero, 2012), ya que la dosis y el grosor de la gota que ingresa al tracto digestivo se controlan mecánicamente antes de la administración. Además, se ha demostrado que no causa efectos adversos sobre la salud o el rendimiento de las aves (Corrier y col., 1990; Milbradt y col., 2014). Puede efectuarse de manera automática en los gabinetes de aspersión que se usan de forma rutinaria para la vacunación en las plantas incubadoras (Chen y col., 1998) o en forma manual a través de aspersores tipo mochilas. El equipo utilizado para administrar el probiótico, la dosificación y la habilidad del personal que lo administra, son factores clave que deben considerarse cuando se aplican probióticos por aspersión. Pivnick y Nurmi (1982) fueron los primeros en usar aerosoles como método de administración de probióticos. Ghadban (1998 y 1999) informó que la aplicación por aspersión de las preparaciones de exclusión competitiva era un método efectivo para el control de *Salmonella* spp. y *E. coli*, y mejoraba los parámetros productivos de los pollos tratados.

1.8. Monitoreo de los probióticos

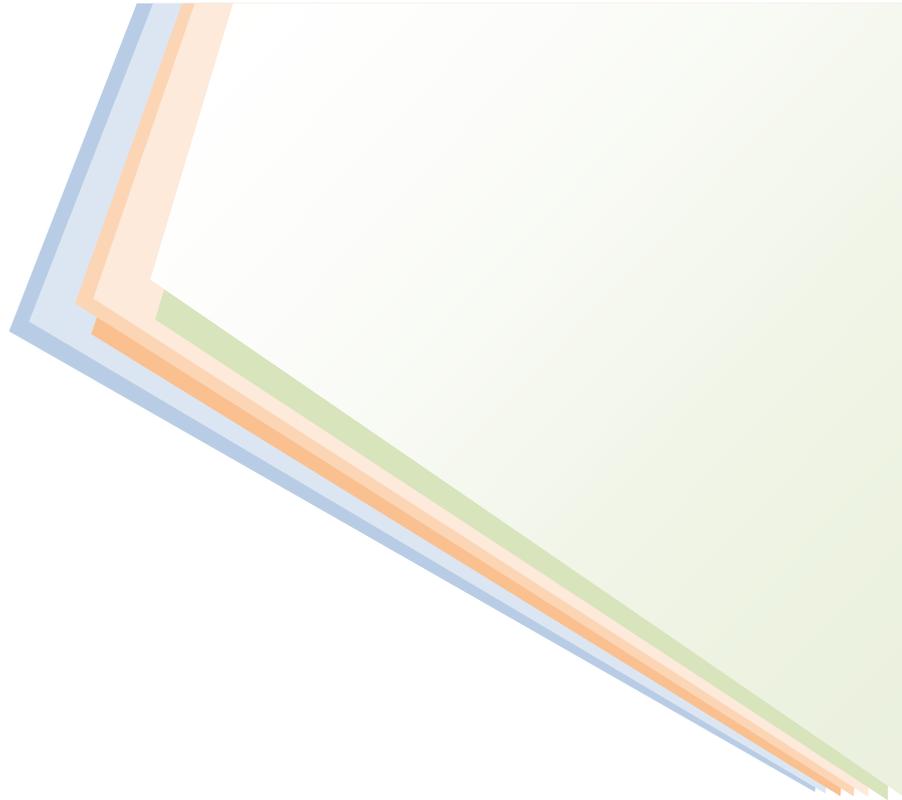
El conocimiento relacionado con el destino de las bacterias probióticas dentro del ambiente complejo de la microbiota intestinal es muy escaso y el estudio de la distribución de estas bacterias *in vivo* representa un gran desafío. La localización y el desplazamiento de los probióticos durante su tránsito por el TGI, así como su interacción con el sistema inmune del hospedador o con la microbiota endógena, se han comenzado a estudiar pero aún no están bien entendidos (Yu y col., 2007; Sattler y col., 2014).

Ehrmann y col. (2002) generaron cepas de *L. animalis* TMW1.972 y *L. salivarius* TMW 1.992 resistentes a rifampicina y eritromicina para poder detectar la presencia de los microorganismos administrados durante el ensayo *in vivo* en pollos parrilleros. Las cepas resistentes al antibiótico se obtuvieron por cultivos seriales en medio MRS, desde niveles bajos hasta una concentración de 100 µg/ml de rifampicina. La generación de mutantes resistentes a rifampicina facilitó la enumeración y el aislamiento de los microorganismos integrantes del inóculo, y permitió diferenciarlos fácilmente de la microbiota indígena intestinal. Además, permitió verificar la ausencia de los microorganismos inoculados en tejidos extraintestinales, permitiendo aseverar sus características GRAS.

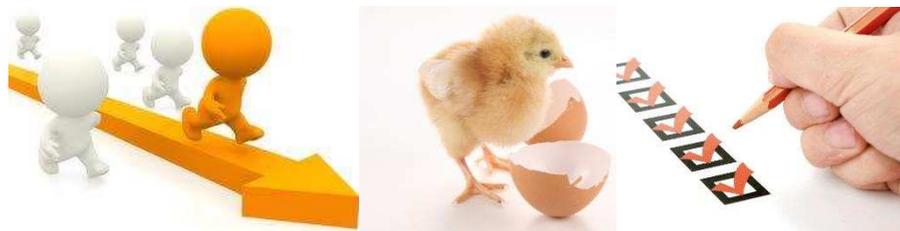
La técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) fue utilizada (Feng y col., 2010) para analizar los cambios en la microbiota intestinal de pollos infectados con *C. perfringens*. La DGGE es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño, pero con diferente secuencia de nucleótidos. De manera similar, la DGGE podría ser un método exitoso para monitorear *in vivo* las cepas que conforman un inóculo probiótico y tipificar el consorcio microbiano presente en el TGI luego de su administración. La composición de la microbiota del ciego de pollos parrilleros fue estudiada por Zhu y Joerger (2003) mediante hibridación *in situ* fluorescente, técnica basada en la utilización de sondas de ADN complementarias de regiones específicas de los ARNr 16S y marcadas con fluorocromos. Yu y col. (2007) desarrollaron un sistema que permitió el seguimiento y la identificación de *L. delbrueckii* subsp- *lactis* D17 y *L. fructosus* C2 a lo largo del TGI de pollos parrilleros. Las cepas en estudio se

transformaron con un vector responsable de la expresión de la proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein* [GFP]). Los resultados obtenidos demostraron que las características de las cepas no eran afectadas por la introducción del vector exógeno y que el sistema de marcado fluorescente constituía una herramienta útil para el monitoreo de los lactobacilos.

En este contexto, a partir de los principios antes mencionados, puede afirmarse que resulta de interés el estudio de microorganismos autóctonos y la evaluación de su capacidad probiótica *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. Adicionalmente, ante la disponibilidad de diferentes técnicas de monitoreo aplicables a estos estudios, resulta importante tratar de establecer qué metodología nos permitiría acceder a la mejor información, a fin de facilitar el desarrollo de nuevas investigaciones.



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



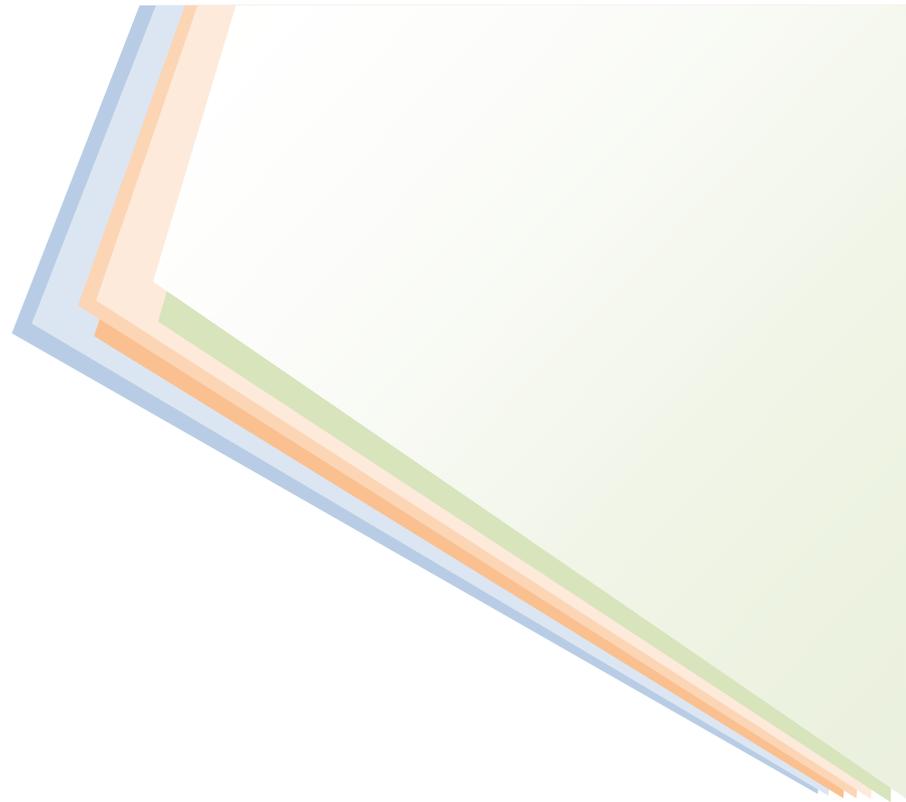
2.1 Hipótesis

A partir de la microbiota indígena de pollos parrilleros se puede obtener un importante número y variedad de BAL, algunas de las cuales poseen propiedades probióticas que contribuirán a disminuir la incidencia de las infecciones intestinales de pollos parrilleros y mejorarán su performance de crecimiento. La utilización de diferentes técnicas de monitoreo permitirá determinar la localización y la carga microbiana de las bacterias probióticas en diferentes regiones del TGI y evaluar la capacidad de translocación de las cepas probióticas a tejidos extraintestinales.

2.2 Objetivo general: desarrollar un inóculo probiótico para pollos parrilleros formulado con BAL indígenas del tracto digestivo de pollos y establecer un método de monitoreo del probiótico una vez administrado a los animales.

2.3 Objetivos específicos:

1. Evaluar el potencial de un inóculo de BAL seleccionadas para mejorar los índices de conversión y la ganancia de peso de los animales inoculados durante la cría de pollos parrilleros.
2. Utilizar diferentes técnicas (generación de mutantes resistentes a rifampicina, DGGE y tinción con FITC) para determinar la localización y la carga microbiana de las bacterias probióticas en diferentes regiones del tracto gastrointestinal.
3. Utilizar las técnicas mencionadas para evaluar la capacidad de translocación de las cepas probióticas a tejidos extraintestinales.



3. MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 Microorganismos

El Departamento de Salud Pública Veterinaria (DSPV) ha realizado aislamientos de microorganismos indígenas a partir del TGI de pollos, los que se encuentran incorporados a una colección de cultivos. Once cepas autóctonas de BAL: *Lactobacillus salivarius* DSPV 001P, *L. salivarius* DSPV 002P, *L. salivarius* DSPV 003P, *L. agilis* DSPV 004P, *L. agilis* DSPV 005P, *L. salivarius* DSPV 006P, *L. salivarius* DSPV 007P, *L. salivarius* DSPV 008P, *L. agilis* DSPV 009P, *L. salivarius* DSPV 010P y *L. salivarius* DSPV 011P, demostraron poseer características que las hacen buenos exponentes para ser incorporados a la dieta de los pollos como un inóculo probiótico de aplicación biotecnológica. De las 11 cepas, 3 fueron elegidas para el estudio de las propiedades tecnológicas y propiedades probióticas *in vivo*: *L. salivarius* DSPV 001P aislada desde yeyuno, por ser la que mejor toleró las condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro*, *L. salivarius* DSPV 003P aislada desde buche, por presentar elevada hidrofobicidad y *L. agilis* DSPV 004P aislada desde ciego, por ser buena productora de peróxido de hidrógeno (Blajman y col., 2015). Todas las cepas fueron suspendidas en medio caldo Triptona Soya con 17 % de glicerol y 5 % de suero equino inactivado, y luego congeladas hasta su utilización.

3.2 Evaluación de la leche como medio de crecimiento de cepas probióticas aviares

Tres cepas bacterianas de origen aviar fueron utilizadas: *L. salivarius* DSPV 001P, *L. salivarius* DSPV 003P y *L. agilis* DSPV 004P, las cuales fueron aisladas del TGI de pollos sanos y demostraron inocuidad y potencial probiótico a través de ensayos *in vitro* (Gaziano, 2012; Blajman y col., 2015). Sus números de acceso al Genbank son KU295171, KU295172 y KU295173, respectivamente. Las cepas fueron propagadas dos veces en medio MRS (De Man y col., 1960) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), para la posterior inoculación en los siguientes medios: caldo MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) como control positivo para el desarrollo de las BAL y leche descremada en polvo reconstituida con agua bidestilada estéril (10 % p/v) (Corlasa, Esperanza, Argentina). Los cultivos frescos puros de cada cepa fueron

sembrados al 1 % en tubos falcon conteniendo cada uno de los medios a ensayar. Los cultivos fueron incubados a 37 °C durante 24 h en una estufa en atmósfera convencional. Posteriormente, a partir de alícuotas de 1 ml, se efectuaron diluciones decimales en Ringer ¼ (Biokar, Beauvais, Francia) de cada una de las cepas en cada medio, y la siembra en profundidad en placas con medio MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) para el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC). La totalidad de las placas fue incubada en anaerobiosis a 37 °C por 72 h. Pasado ese período de tiempo, se procedió a realizar el recuento de las UFC/ml.

Todas las experiencias fueron realizadas por duplicado. Las pruebas estadísticas fueron ejecutadas mediante el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), implementándose un ANOVA y test de Duncan para determinar si existían diferencias significativas en el recuento del número de las UFC al utilizar como medio de cultivo un producto de la industria láctea.

3.3 Influencia de la suplementación con BAL de origen aviar sobre la microbiota intestinal y la translocación bacteriana en pollos parrilleros

3.3.1 Animales e instalaciones

Cien pollos parrilleros de un día de vida fueron alojados en cuatro corrales (25 pollos/corral) de 11.328 m² cada uno, montados sobre piso de cemento cubierto por viruta de madera. La temperatura del galpón fue regulada a 37 °C hasta el d 21 mediante el encendido de campanas a gas y el empleo de cortinas. Se proporcionó un fotoperíodo cercano a luz continua (23 horas luz: 1 hora oscuridad) y los animales fueron alimentados con concentrado comercial sin medicamentos y agua. Este ensayo fue realizado en la Unidad Didáctico-Productiva de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional del Litoral (UNL).

3.3.2 Microorganismos y obtención de mutantes resistentes a rifampicina

Con el objetivo de poder monitorear a los microorganismos potencialmente probióticos en los ensayos *in vivo*, se obtuvieron mutantes resistentes a rifampicina de las cepas *L. salivarius* DSPV 001P, *L. salivarius* DSPV 003P y *L. agilis* DSPV 004P. Las cepas resistentes al antibiótico se obtuvieron por cultivos seriados en placas con medio MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y concentraciones crecientes de rifampicina (Richet, Buenos Aires, Argentina), comenzando con 0,2 µg/ml y llegando a la concentración final de 100 µg/ml (Demecková y col., 2002; Ehrmann y col., 2002). Los parámetros fisiológicos y bioquímicos de las cepas originales y las resistentes fueron comparados para comprobar que la única diferencia entre ambas era la resistencia al antibiótico.

3.3.3 Preparación y administración de los microorganismos

Las cepas resistentes fueron descongeladas a temperatura ambiente. Un cultivo *overnight* de cada BAL fue repicado en un volumen de 10 ml de caldo MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y posteriormente incubado a 37 °C durante 18 h en una estufa en atmósfera convencional. Seguidamente, estos cultivos fueron sembrados al 1 % en enlenmeyers conteniendo leche estéril (Corlasa, Esperanza, Argentina) e incubados durante 18 h a 37 °C. La concentración bacteriana se calculó mediante recuento del número de UFC. Los microorganismos fueron administrados a los pollos en bebederos plásticos transparentes, en una dosis de 250 ml de leche por corral (aproximadamente 10 ml/animal) y diluido en agua de bebida en partes iguales. El grupo control recibió leche diluida en agua de bebida en partes iguales como placebo.

3.3.4 Diseño del experimento

Los pollos fueron divididos en 4 grupos experimentales conformados por 25 animales cada uno (grupo cepa *L. salivarius* DSPV 001P, grupo cepa *L. salivarius* DSPV 003P, grupo cepa *L. agilis* DSPV 004P y grupo control). El cuidado de los animales se realizó teniendo en cuenta la Guía para el Cuidado y Uso de Animales en Investigación y Enseñanza (FASS, 1998). Los procedimientos utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de

Ética y Seguridad de la FCV-UNL. La administración de BAL se realizó desde el día 5 hasta el día 9 de vida de los animales. Las variables cuantificadas fueron recuento de las cepas administradas y recuento de coliformes y enterobacterias en ciego, buche e hígado luego de 24 y 72 h de administración de las cepas potencialmente probióticas.

3.3.5 Necropsias

A las 24 y 48 h de haber administrado las cepas de BAL, dos pollos al azar de cada grupo experimental (ocho pollos en total) fueron sacrificados por dislocación cervical. Se recolectaron los siguientes órganos para análisis microbiológicos: hígado, buche y ciego en esta secuencia utilizando instrumental estéril para cada tejido a fin de minimizar la contaminación bacteriana entre muestras (Lee y col., 2000).

3.3.6 Pruebas microbiológicas

Las muestras de ciego y buche fueron diluidas 1/100 en solución Ringer ¼ (Biokar, Beauvais, Francia). Posteriormente se disgregaron mediante movimiento en giro de un imán sobre un agitador magnético. Luego se efectuaron diluciones decimales seriadas y a partir de éstas, la siembra por duplicado en placas con medio MRS pH 6,2 ± 0,2 (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y 100 µg/ml de rifampicina (Richet, Buenos Aires, Argentina) para recuperar solamente las BAL administradas. Las placas de Petri fueron incubadas a 37 °C en condiciones de anaerobiosis y luego de 72 h se realizó el recuento del número de UFC. La presencia de las cepas en el TGI fue interpretada como asociación al epitelio y/o colonización por esas bacterias (Lee y col., 2000). Asimismo, las diluciones fueron sembradas en placas conteniendo VRBL (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y VRBG (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), e incubadas a 44 y 37 °C durante 24 h para el recuento de coliformes fecales y enterobacterias, respectivamente.

3.3.7 Prueba de translocación

Para evaluar la capacidad de translocación, trozos de hígado obtenidos en condiciones asépticas fueron pesados y homogeneizados en un Stomacher 80 Biomaster (Seward, Thetford, Reino Unido) en 100 ml de solución Ringer ¼

(Biokar, Beauvais, Francia). Para evaluar la translocación los homogenatos fueron sembrados en los siguientes medios: MRS_{rif} (100 µg/ml) para el recuento de las cepas administradas, VRBL (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) para el recuento de coliformes y VRBG (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) para el recuento de enterobacterias. Luego del período de incubación para cada grupo bacteriano, se realizó el recuento de UFC.

3.3.8 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media aritmética y sus desvíos estándares (DS). Los mismos se procesaron mediante el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), implementándose un ANOVA y el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos para los recuentos de UFC en las porciones del TGI e hígado.

3.4 Influencia de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P en cultivo fresco sobre la microbiota intestinal, la translocación bacteriana, la ganancia de peso y el índice de conversión de pollos parrilleros

3.4.1 Animales e instalaciones

Setecientos veinte pollos parrilleros de un día de vida fueron alojados en seis corrales (120 pollos/corral) de 11.328 m² cada uno, montados sobre piso de cemento cubierto por viruta de madera. La temperatura del galpón fue regulada a 37 °C hasta el día 21 mediante el encendido de campanas a gas y el empleo de cortinas. Se proporcionó un fotoperíodo cercano a luz continua (23 horas luz: 1 hora oscuridad), y los animales fueron alimentados con concentrado comercial sin medicamentos y agua. El ensayo fue realizado en la Unidad Didáctico-Productiva de la FCV-UNL. Hasta el día 28 de la crianza, se administró un alimento concentrado peleteado comercial iniciador (Avigan, Humboldt, Argentina), mientras que a partir del día 28 y hasta la finalización del ensayo, se suministró un alimento concentrado peleteado comercial terminador (Avigan, Humboldt, Argentina). La fórmula del concentrado comercial se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Composición de los alimentos

Alimento iniciador (0-4 semanas)

Alimento terminador (5-6 semanas)

Ingredientes:	Ingredientes:
Maíz	Maíz
Sorgo	Sorgo
Conchilla	Trigo
Sal	Avena
Harina de carne vacuna	Cebada
Harina de plumas de pollo	Afrechillo de trigo
Aceite de pollo	Gluten feed
Expeller de girasol	Harina de carne vacuna
Pellets de girasol	Harina de trigo de aves
Poroto de soja desactivado	Aceite de pollo
Expeller de soja	Expeller de girasol
Afrechillo de trigo	Pellets de girasol
Lisina	Poroto de soja desactivado
Metionina	Expeller de soja
Vitaminas A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12	Pellets de soja
Ácido nicotínico	Conchilla
Pantotenato de calcio	Carbonato de calcio
Ácido fólico	Fosfato
Colina 70%	Sal
Manganeso	Lisina
Cobre	Metionina
Zinc	Vitaminas A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12
Hierro	Ácido nicotínico
Yodo	Pantotenato de calcio
Cobalto	Ácido fólico

Selenio	Colina 25%
Antioxidante (BHT)	Manganeso
	Cobre
	Zinc
	Hierro
	Yodo
	Cobalto
	Selenio
	Antioxidante BHT
Contenido nutricional:	Contenido nutricional:
Proteína bruta 22%	Proteína bruta 19%
Extracto etéreo 8,5%	Extracto etéreo mínimo 8,5%
Fibra cruda máxima 3,2%	Fibra cruda máxima 3%
Humedad máxima 12%	Humedad máxima 12%
Calcio 0,8 to 1,5%	Calcio 0,75 to 1%
Fósforo 0,35 to 0,5%	Fósforo 0,35 to 0,5%
Cenizas totales 6%	Cenizas totales 6%
Energía metabolizable en base seca 3,150 Kcal/kg	Energía metabolizable en base seca 3,200 Kcal/Kg

3.4.2 Microorganismos

Para el estudio se utilizó la cepa bacteriana de origen aviar *L. salivarius* DSPV 001P resistente a rifampicina.

3.4.3 Preparación y administración del inóculo

La cepa resistente fue descongelada a temperatura ambiente. Se realizaron dos pases en caldo MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), los cuales fueron incubados a 37 °C durante 18 h en estufa en atmósfera convencional. Seguidamente, el cultivo fue sembrado al 1 % en frascos conteniendo leche comercial en polvo (Corlasa, Esperanza, Argentina) reconstituida con agua bidestilada (10 % p/v) y esterilizada, e incubado durante 18 h a 37 °C. La

concentración bacteriana se calculó mediante la determinación del número de UFC. El microorganismo fue administrado a los pollos en bebederos plásticos transparentes, en una dosis de 1,2 l de leche por corral (10 ml/animal) y diluido en agua de bebida en partes iguales. El microorganismo fue suministrado durante los 42 d que duró el experimento en una dosis de al menos 1×10^9 UFC/pollo. El grupo control fue alimentado con 1,2 l de leche por corral diluido en agua de bebida en partes iguales.

3.4.4 Diseño del experimento

Los animales se dividieron en dos grupos experimentales de 360 ejemplares cada uno, homogéneos en su peso: grupo control (G-C) y grupo probiótico (G-P). El cuidado de los animales se realizó teniendo en cuenta la Guía para el Cuidado y Uso de Animales en Investigación y Enseñanza (FASS, 1998). Los procedimientos utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética y Seguridad de la FCV-UNL. El ensayo se realizó en tres réplicas. Treinta pollos parrilleros de cada una de las réplicas fueron identificados mediante caravanas para determinar su peso individual. Las variables calculadas semanalmente fueron: peso, consumo de alimento, eficiencia de conversión alimenticia, longitud de ciego, peso de bazo y bolsa de Fabricio, recuento de BAL resistentes a rifampicina, recuento de coliformes y enterobacterias en ciego, buche e hígado. El consumo de alimentos fue calculado en base al consumo de alimento concentrado peleteado comercial. La ganancia de peso vivo fue obtenida por diferencia entre pesos en el período de tiempo correspondiente. La conversión alimenticia fue calculada relacionando el consumo de alimentos y la ganancia de peso vivo.

3.4.5 Normas de bioseguridad

Un conjunto de prácticas de manejo fueron diseñadas para prevenir la entrada, transmisión y diseminación de la cepa probiótica al G-C. En líneas generales, se contempló la utilización de mamelucos y calzado descartable diferentes para el G-P y el G-C, la aplicación de un desinfectante en spray antes de ingresar y al salir de cada grupo, la colocación de bandejas con cal en las puertas de entrada a cada box, la prohibición del ingreso de visitas y personal ajeno al ensayo, y la adecuada disposición de los cadáveres en fosas para depósito.

3.4.6 Necropsias

Veinticuatro horas post administración del probiótico, se efectuó el sacrificio al azar mediante dislocación cervical de seis pollos inoculados y seis pollos controles (uno por réplica). La eutanasia se repitió una vez por semana durante todo el período de crianza de las aves. Se recolectaron los siguientes órganos para análisis microbiológicos: hígado, buche y ciego, en esta secuencia utilizando instrumental estéril en cada tejido para minimizar la posibilidad de contaminación bacteriana entre muestras (Lee y col., 2000). Asimismo, se determinó longitud de ciego, peso de bazo y bolsa de Fabricio.

3.4.7 Recuperación del inóculo

Las muestras de ciego y buche recogidos fueron diluidas 1/100 en solución Ringer ¼ (Biokar, Beauvais, Francia) y disgregadas en un agitador magnético. Posteriormente se efectuaron diluciones decimales seriadas y a partir de éstas, la siembra por duplicado en placas con medio MRS pH 6,2 ± 0,2 (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y 100 µg/ml de rifampicina (Richet, Buenos Aires, Argentina) para recuperar solamente la BAL administrada. Las placas de Petri fueron incubadas a 37 °C en condiciones de anaerobiosis y luego de 72 h se realizó el recuento de las UFC. La presencia de la cepa en el TGI fue interpretada como asociación al epitelio y/o colonización por esa bacteria (Lee y col., 2000). Asimismo, las diluciones fueron sembradas en placas conteniendo VRBL (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y VRBG (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), e incubadas a 44 y 37 °C durante 24 h para el recuento de coliformes fecales y enterobacterias, respectivamente.

3.4.8 Prueba de translocación

Los trozos de hígado fueron homogeneizados con un stomacher 80 biomaster (Seward, Worthing, Reino Unido) en solución Ringer ¼ (Biokar, Beauvais, Francia). Para medir la translocación los homogenatos fueron sembrados en los siguientes medios: MRS_{rif} para el recuento de la cepa administrada, VRBL para coliformes (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y VRBG para enterobacterias (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido).

3.4.9 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media aritmética y sus DS. Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados mediante el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), implementándose ANOVA y Test de medidas repetidas.

3.5 Conservación de *L. salivarius* DSPV 001P de origen aviar mediante liofilización

En este ensayo se evaluó la conservación mediante el proceso de liofilización de la cepa de origen aviar *L. salivarius* DSPV 001P a diferentes condiciones medio-ambientales durante 12 semanas (temperatura ambiente a 25 °C y refrigeración a 4 °C) y durante 12 meses (-20 °C), con el fin de asegurar la concentración bacteriana óptima en el producto probiótico final a administrar a los pollos parrilleros del próximo ensayo. Un cultivo fresco de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P crecido en caldo MRS pH 6,2 ± 0,2 (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) fue centrifugado a 5000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y las células fueron lavadas dos veces con tampón fosfato salino (PBS). El sedimento se resuspendió en leche descremada estéril al 6 % (Corlasa, Esperanza, Argentina). La suspensión se congeló a -80 °C por 18 h y luego fue liofilizada a 0,044 mbar durante 27 h. El polvo liofilizado obtenido se dividió en tres tubos falcon estériles. Los mismos fueron dispuestos a temperatura ambiente (25 °C), 4 °C y -20 °C. El recuento del número de células viables se realizó al día 0 y cada 7 d durante un período de 3 meses para los liofilizados conservados a 25 °C y 4 °C, y también a los 4, 5, 6 y 12 meses para el liofilizado dispuesto a -20 °C. Para ello se sembraron diluciones decimales en solución Ringer ¼ (Biokar, Beauvais, Francia) en placas con agar MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Las mismas fueron incubadas a 37 °C durante 72 h en anaerobiosis. Los datos de viabilidad fueron analizados mediante el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), implementándose un ANOVA con medidas repetidas y Test de Duncan.

3.6 Colonización de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P liofilizada en el TGI de pollos parrilleros

El objetivo de este estudio fue evaluar la colonización y persistencia de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P liofilizada resistente a rifampicina durante 45 d. En el proceso de fermentación en batch se empleó permeado de suero de queso al 6% (Arla Food Ingredients, Porteña, Argentina), extracto de levadura al 0,8% (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), 0,003 g/l de sulfato de manganeso (Merck, Darmstadt, Alemania) y 20 g/l de peptona de caseína (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos) como medio de cultivo. Se utilizó un fermentador tipo tanque agitado (Figmay, Córdoba, Argentina) empleando un volumen de trabajo de 4 l, con 2 % de inóculo inicial. La agitación se fijó en 120 rpm y la temperatura a 37 °C. El pH fue regulado a 6 cada 7 min. Luego de 6 h de incubación, se agregaron 200 ml de permeado de suero de queso al 15 % (Arla Food Ingredients, Porteña, Argentina) y 200 ml de peptona de caseína al 10% (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos), ambos esterilizados a vapor fluyente. Se continuó con la regulación del pH y la incubación se realizó durante 18 h. El cultivo fue centrifugado a 5000 *g* durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y el sedimento lavado dos veces con tampón fosfato salino (PBS). El sedimento se resuspendió en leche descremada estéril al 6 % (Corlasa, Esperanza, Argentina). La suspensión se congeló a -80 °C por 18 h y luego fue liofilizada a 0,044 mbar durante 27 h. El polvo liofilizado obtenido fue conservado a -20 °C hasta su utilización.

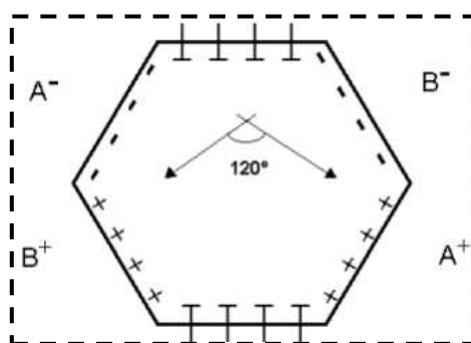
En este ensayo se emplearon 96 pollos parrilleros de 1 día de vida, divididos en tres réplicas de 32 pollos. El cuidado de los animales se realizó teniendo en cuenta la Guía para el Cuidado y Uso de Animales en Investigación y Enseñanza (FASS, 1998). Los procedimientos utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética y Seguridad de la FCV-UNL. La cepa fue suministrada con la dieta en una dosis de 1×10^{10} UFC/pollo durante 9 d y 1×10^9 UFC/pollo durante los 7 días restantes. Al día 0, 48 h post-inoculación y una vez por semana, 6 pollos tomados al azar (2 por réplica) fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Se tomaron asépticamente muestras de buche y ciego. Para recuperar la cepa administrada, las muestras fueron sembradas en placas con agar MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) suplementado con

100 µg/ml de rifampicina (Richet, Buenos Aires, Argentina) e incubadas en anaerobiosis a 37 °C durante 72 h. Posteriormente, se realizó el recuento de las UFC/g.

3.7 Monitoreo de *L. salivarius* DSPV 001P mediante electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE)

Este experimento fue diseñado con la finalidad de comprobar si la cepa administrada a los pollos parrilleros presentaba diferencias con la recuperada desde el TGI. Para obtener el perfil genómico de todas las cepas (*L. salivarius* DSPV 001P wildtype, *L. salivarius* DSPV 001P resistente a rifampicina, *L. salivarius* DSPV 001P liofilizada, *L. salivarius* DSPV 001P recuperada de buche y *L. salivarius* DSPV 001P recuperada de ciego) se usó la metodología basada en PFGE que separa moléculas de ADN en matrices de agarosa sometiéndolas a campos eléctricos que se alternan en dos direcciones. Esta técnica molecular permite identificar cepas de la misma especie, para así poder determinar diferencias genéticas entre ellas por medio de la digestión y separación de moléculas de ADN total con tamaños desde 20 kpb hasta 10 Mpb. De todos los sistemas desarrollados, el más extendido ha sido el CHEF (Clamped Homogeneous Electric Field electrophoresis), que se caracteriza por obtener líneas rectas empleando campos homogéneos. En este sistema, se utiliza un arreglo hexagonal con veinticuatro electrodos (Figura 2).

Figura 2. Esquema de la distribución de electrodos en el sistema CHEF de electroforesis en campo pulsado. El ángulo señalado (120°) es el de reorientación entre el campo eléctrico A y el B.



Adaptado de Coll y col., (2005)

En función del número de diferencias entre dos patrones (Tenover y col., 1995), las diferencias entre cepas de la misma especie se clasifican en:

a.- Idénticas, iguales o indistinguibles (similitud 100 %): cuando dos cepas presentan el mismo número de bandas y éstas tienen aparentemente el mismo tamaño, se dice que ambas representan el mismo clon.

b.- Cercanamente relacionadas (similitud del 85-100 %): cuando el número de diferencias es \leq a 3. Esto es debido a que un único cambio genético (mutación espontánea que afecte un lugar de restricción) se traduce en un máximo de 3 diferencias entre los patrones de una cepa y su ancestro. En este caso, las dos cepas pueden considerarse genéticamente relacionadas (una subtipo de la otra o ambas derivadas de un ancestro común).

c.- Posiblemente relacionadas (similitud del 65-85 %): cuando los cambios entre dos patrones pueden ser atribuidos a dos hechos genéticos independientes, el número de cambios puede llegar a ser hasta de 6 (inserciones o deleciones de ADN, o ganancia o pérdida de sitios de restricción).

d.- No relacionadas (similitud menor al 65 %): cuando los cambios entre los dos patrones son atribuibles a 3 o más cambios genéticos independientes, lo cual se traduce en un número de diferencias $>$ a 6. En este caso se interpreta que las dos cepas pertenecen a clones diferentes, sin ninguna relación.

3.7.1 Preparación del ADN genómico

Un cultivo *overnight* de cada cepa fue repicado en un volumen de 4 ml de caldo MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y posteriormente incubado a 37 °C durante 18 h en estufa en atmósfera convencional. Los mismos fueron centrifugados durante 5 min a 13.000 *g*. El sobrenadante fue descartado y el sedimento resuspendido en 1,8 ml de Cl Na 0,85 % (Biopack, Buenos Aires, Argentina). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm, ajustando la concentración de las suspensiones celulares a DO 2.0. La agarosa de bajo punto de fusión 2 % (Pulsed Field Certified Agarose, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos) fue calentada en el microondas a potencia baja y mantenida en baño termostático a 55 °C. Posteriormente, tubos de

centrífuga de 1,5 ml y los pocillos de los moldes para “plugs” se rotularon con los nombres de los cultivos. Un volumen de 150 µl de las suspensiones celulares ajustadas fue transferido a los microtubos de 1,5 ml rotulados. Seguidamente, 150 µl de agarosa fundida fueron adicionados a los 150 µl de suspensión celular. Inmediatamente, la mezcla fue dispensada en los pocillos del molde para “plugs”, evitando la formación de burbujas. Se prepararon dos “plugs” por muestra, los cuales se dejaron solidificar en la heladera (4 °C) durante 5 min. Los moldes se abrieron y los “plugs” fueron transferidos con una espátula a los tubos falcon conteniendo tampón NET con lisozima (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos). Los tubos fueron colocados en una gradilla e incubados en un baño termostatzado a 37 °C durante 24 h. Cada trozo de agarosa se transfirió a un tubo falcon con tampón de lisis Tris 50 mM, ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 50 mM pH 8 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos), lauril sarcosina sódica 1 % (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos) y proteinasa K 0,5 mg/ml (Promega, Madison, USA) y se incubó a 37 °C durante 24 h. Luego, los tubos fueron retirados del baño termostatzado y el tampón de lisis descartado cuidadosamente. Para los lavados, se añadió 10 ml de tampón Tris-EDTA (TE) estéril (Tris 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8.0), dejándose en baño termostatzado a 55 °C durante 40 min (este paso de lavado se repitió cuatro veces) (Doulgeraki y col., 2010). Finalmente, los trozos de agarosa se trasladaron a microtubos con 2 ml de tampón TE 1X estéril, y se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización posterior.

3.7.2 Digestión del ADN genómico

Para la digestión enzimática se realizó una dilución del tampón 10X con agua de calidad molecular y la enzima de restricción *SmaI* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos). Cada trozo de agarosa fue digerido con 15 unidades de enzima durante un tiempo de incubación de 5 h a 25 °C (Li y col., 2007).

3.7.3 Electroforesis en campos pulsados

Los fragmentos de ADN digeridos dentro del trozo de agarosa fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa para PFGE al 2 % en tampón TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA). Una vez solidificado el gel, se incorporó

medio trozo de agarosa en un pozo y se adicionó una capa de agarosa al 2 % como sellador. La electroforesis se llevó a cabo en un equipo de electroforesis en campo pulsado CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos) con tampón TBE 0,5X. Las condiciones electroforéticas fueron las siguientes: 6 V/cm (cambio de orientación inicial 5 s, cambio de orientación final 35 s) durante 18 h a 14 °C. Después de la electroforesis, los geles fueron teñidos durante 30 min en bromuro de etidio (10 mg/ml) (Bio Basic Inc., Markham, Canadá) y visualizados con luz UV en un transiluminador (BioAmerica Inc., Miami, Estados Unidos).

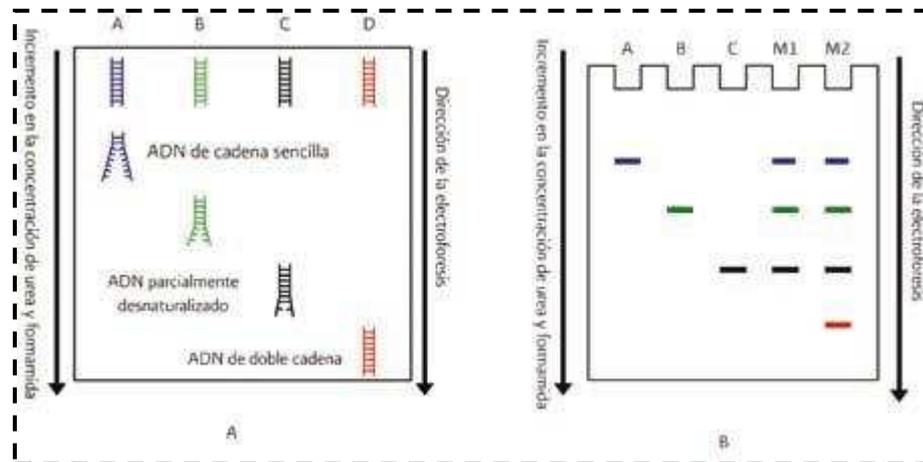
3.7.4 Análisis de los patrones de PFGE

Los perfiles electroforéticos obtenidos por PFGE se analizaron con el software PyElph 1.4 para obtener el dendrograma. El método de alineación utilizado fue el ligamiento promedio no ponderado (UPGMA), basado en un coeficiente de similitud “Dice” y una tolerancia en la posición de bandas de 1 %. El dendrograma fue analizado de acuerdo al criterio de tipificación de cepas bacterianas (Tenover y col., 1995), para determinar si existían diferencias entre las cepas en estudio.

3.8 Análisis de la dinámica poblacional de la microbiota predominante del ciego de pollos parrilleros

La finalidad de este ensayo fue analizar la microbiota predominante del ciego de pollos parrilleros tratados durante 16 d con la cepa *L. salivarius* DSPV 001P mediante DGGE, como así también establecer un método de monitoreo de la cepa administrada. En la DGGE, fragmentos de ADN del mismo tamaño (fragmentos A, B, C y D -Figura 3-) se separan de acuerdo a su secuencia nucleotídica.

Figura 3. Fragmentos de ADN con diferentes secuencias nucleotídicas separados por DGGE.



Adaptado de Fernández Suárez y Le Borgne (2014)

Aquellos fragmentos de ADN pobres en guanina-citosina (fragmento A) se desnaturalizan a bajas concentraciones de urea y formamida, por lo que su migración en el gel se interrumpe rápidamente y ocupan posiciones superiores. Ocurre lo contrario con los fragmentos de ADN ricos en guanina-citosina (fragmento D), cuya migración por el gel solo se retarda a altas concentraciones de urea y formamida, ocupando posiciones inferiores. B) M1, mezcla de fragmentos A, B y C; M2, mezcla de fragmentos A, B, C y D (Figura 3).

Quincenalmente, una fracción de 0,2 g del contenido de ciego de 2 pollos parrilleros pertenecientes a 3 corrales diferentes (6 pollos en total) fue tomada y conservada en microtubos de 1,5 ml con medio PBS a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

3.8.1 Extracción de ADN de las muestras de ciego

Para la extracción de ADN de todas las muestras de ciego se empleó un Kit comercial (DNA Purification Kit Promega, Madison, Estados Unidos). El protocolo utilizado para la extracción de ADN bacteriano fue el siguiente:

1. Tomar los 0,2 g de ciego resuspendidos en PBS estéril. Centrifugar a 13.000 *g* durante 2 min y descartar el sobrenadante.
2. Suspender el sedimento en 480 μ l de EDTA 50mM (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos).
3. Agregar 120 μ l de lisozima (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos).
4. Incubar a 37 °C por 30-60 min.
5. Centrifugar a 13.000 *g* durante 2 min y descartar el sobrenadante.

A. **Lisis celular**

1. Resuspender el sedimento en microtubos con 600 μ l de la solución de lisis (Nuclei Lysis Solution). Esta contiene tampones y detergentes que ayudan a lisar las bacterias, sin afectar el ADN.
2. Incubar a 80 °C durante 10 min. La temperatura alta también ayuda a desestabilizar la membrana. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
3. Añadir 3 μ l de la solución de RNAsa y mezclar invirtiendo el tubo. La RNAsa es una nucleasa que cataliza la degradación del RNA en componentes más pequeños. Esto permite que nuestro producto quede libre de ARN.
4. Incubar a 37 °C (temperatura de activación de la RNAsa) durante 15 min y dejar enfriar a temperatura ambiente.

B. **Precipitación de proteínas**

1. Añadir 200 μ l de la solución de precipitación de proteína. Mezclar con vórtex durante 20 s.
2. Incubar en hielo durante 5 min.
3. Centrifugar a 13.000 *g* durante 3 min.

C. **Purificación** (se utiliza isopropanol y etanol, los cuales ayudan a purificar y/o concentrar ADN, ARN y polisacáridos de soluciones acuosas).

1. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo que ya contiene 600 μ l de isopropanol (A-Iso) (Biopack, Buenos Aires, Argentina) y mezclar por inversión.
2. Centrifugar a 13.000 *g* durante 3 min y descartar el sobrenadante.
3. Añadir 600 μ l de etanol al 70 % (Anedra, San Fernando, Argentina) y mezclar por inversión.

4. Centrifugar a 13.000 *g* durante 3 min.
5. Descartar el etanol. Dejar secar los tubos durante 10 min boca abajo sobre papel toalla.

D. **Rehidratación** (poner el ADN en solución).

1. Rehidratar el pellet de DNA en 100 μ l de la solución de rehidratación. Esta solución posee soluciones tampones que protegen el ADN.
2. Incubar a 65 °C durante 30 min.

3.8.2 Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Previo a la amplificación mediante PCR, la concentración de ADN fue ajustada a 25-50 nmoles/ μ l utilizando el dispositivo Take3 y el software Gen5 para Windows versión 2.01 en un lector multimodal de microplacas (Sinergy HT, Bio-Tek, Winooski, Estados Unidos). Para amplificar la región codificante del gen 16S del ADNr se utilizó el kit GoTaq DNA Polimerase (Promega, Vilnius, Lituania) empleando como primers específicos los oligonucleótidos universales GC-HDA1 y HDA2 (Tabla 3) que amplifican la región V3 del gen del ADNr 16S (200 pb) (Gong y col., 2008). La secuencia nucleotídica de ambos cebadores se muestra en la tabla 4.

Tabla 3. Mezcla utilizada en la reacción de PCR para la amplificación del 16S ADNr.

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	μ l/reacción
Mix	5X	1,3X	13 μ l
Cebador GC-HDA1	10 μ M	0,8 μ M	4 μ l
Cebador HDA2	10 μ M	0,8 μ M	4 μ l
GoTaq DNA Polimerase	5 U/ μ l	0,05 U	0,5 μ l
ADN molde			4 μ l
H ₂ O bidestilada estéril			24,5 μ l
Total (μ l)			50 μ l

Tabla 4. Primers empleados para la amplificación de ADN de la comunidad de bacterias presentes en el ciego de pollos parrilleros.

Cebador	Sentido	Secuencia
CG-HDA1	Forward	5'-CGC CCG GGG CGC GCCCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCCTAC GGG AGG CAG T-3'
HDA2	Reverse	5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTGGCA C-3'

La composición de la Mix empleada para amplificar la fracción 16S del ADNr fue la que se muestra en la tabla 5.

Se empleó un termociclador MiniCycler™ (MJ Research, Waltham, Estados Unidos). Se utilizaron las mismas condiciones para todas las muestras en estudio y las condiciones de amplificación fueron las que se muestran en la tabla 6.

Tabla 5. Solución Stock de Mix para PCR.

Reactivo	Concentración final en la solución stock
5X GoTaq Reaction Buffer* (MgCl ₂ 7,5 mM)	3,85X
dNTPs Mix (dATP+dCTP+dGTP+dTTP)	0,8 μM**

* Promega Catalog#9PIM300.
**Concentración final de cada uno de los desoxiribonucleótidos.

Tabla 6. Condiciones utilizadas para amplificar el ADNr 16S utilizando los *primers* GC-HDA1 y HDA2.

Número de Ciclos	Fase	Tiempo y temperatura
1	Desnaturalización inicial	94 °C durante 5 min
35	Desnaturalización	94 °C durante 30 s
	Hibridación	60 °C durante 1 min

	Polimerización	72 °C durante 30 s
1	Polimerización final	72 °C durante 7 min

A fin de descartar la presencia de contaminaciones indeseadas durante el desarrollo del proceso de amplificación, se empleó un control negativo el cual se constituyó con los reactivos y sus respectivos volúmenes indicados en la tabla 3, a excepción del ADN. Esta mezcla de reacción se sometió junto a las demás muestras, al proceso de amplificación arriba mencionado.

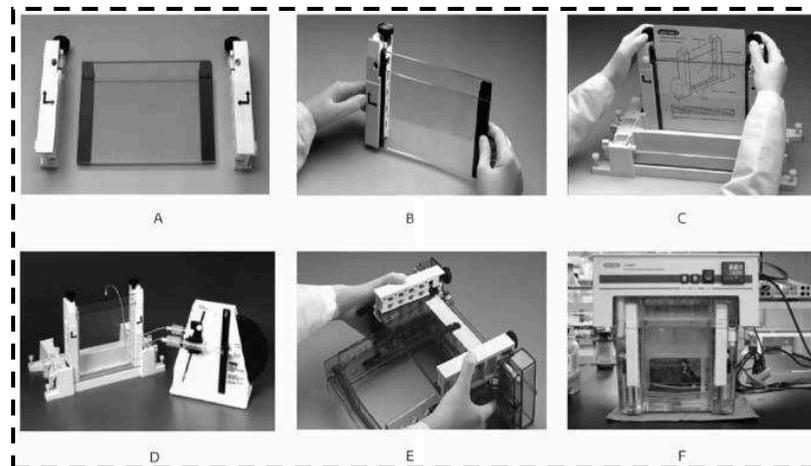
Con el objeto de comprobar la amplificación de la fracción 16S del ADNr se realizó una electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. El gel fue preparado a una concentración del 2 % en tampón TBE 1X. En el instante previo al armado del mismo, sobre soporte acrílico, se suplementó con colorante fluorescente GEL RED (Biotium, Freemont, Estados Unidos) a una concentración final del 0,01 % (v/v). En cada pocillo destinado al producto de PCR fueron depositados 5 µl de muestra y en el pocillo destinado al marcador de peso molecular fueron dispensados 5 µl de solución de marcador de peso molecular comercial 100 pb DNA Ladder (Promega, Madison, Estados Unidos). La electroforesis se realizó a 80V durante 40 min empleando TBE 1X como tampón de corrida. Luego de finalizada la electroforesis el gel fue visualizado con luz UV en un transiluminador (Labnet, Woodbridge, Estados Unidos).

3.8.3 Preparación de los geles, electroforesis y tinción

Los productos de PCR fueron separados mediante DGGE utilizando un equipo equipo D-Code Universal Mutation Detection (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos) en geles de 16 cm x 16 cm x 0,1 cm. Las muestras se sembraron en geles de poliacrilamida 8 % p/v en tampón TAE. La separación óptima se alcanzó empleando gradientes desnaturizantes urea-formamida 40 % a 55 % (100 % corresponde a 7 M de urea y 40 % v/v de formamida). Los geles con gradiente desnaturizante fueron preparados empleando un sistema formador de gradiente constituido por jeringas y mangueras. Dos soluciones con distinta concentración de urea-formamida fueron elaboradas, e inmediatamente antes de su utilización, se agregó a cada solución 16 µl de

TEMED (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos) y 162 μl de persulfato de amonio (Bio-Rad Laboratories, Miami, Estados Unidos) preparado al 10 %. Las soluciones de alta y baja densidad se cargaron en las jeringas y se vaciaron en la cavidad de los cristales. El peine formador de calles se colocó en el espacio existente entre los cristales y el gel se dejó polimerizar durante 60 min. Una vez formado el gel, los vidrios conteniendo el mismo se montaron sobre el soporte correspondiente y se colocaron en la cuba con tampón TAE a 60 °C (Figura 4). Luego se sembraron en cada fosa 10 μl de muestra con 10 μl de buffer de carga loading (2x). En cada extremo de los geles se sembró un patrón constituido por los productos de PCR de las siguientes cepas: *E. faecium* DSPV 22T, *L. salivarius* DSPV 001P, *C. jejuni* C173 y *S. enteritidis* 421. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 130 V durante 4 h a 60 °C. Los geles fueron teñidos con SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) y se visualizaron en un transiluminador Safe Imager Blue-Light (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos).

Figura 4. Secuencia experimental en la preparación y electroforesis de geles de DGGE.



Adaptado de Bio-Rad (1999)

- A) Se muestran las pinzas de sujeción así como ambos cristales (grande y pequeño) separados por los espaciadores. B) Ensamble de cristales con las pinzas de sujeción. C) Ensamble de cristales en la base con la junta de goma. Se muestra la verificación del ensamblaje a través de la tarjeta de alineamiento. D) Ajuste, montaje de accesorios (jeringas y mangueras) y ensamble del sistema formador de gradiente. E)

Ensamble de los cristales en el marco sujetador con electrodos. F)
Electroforesis: se observa el módulo de electroforesis y control de temperatura conectado a la fuente de poder.

3.8.4 Reactivos para DGGE

Tabla 7. Tampón TAE 50X.

Reactivo	Concentración final	Cantidad
Tris Base (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos)	2 M	48,4 g
Ácido acético glacial (Anedra, San Fernando, Argentina)	1 M	11,42 ml
EDTA 0,5M, pH 8 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos)	50 mM	20 ml
H ₂ O _d		a 200 ml

Tabla 8. Solución stock Bis-Acrilamida (37,5:1) 40 %.

Reactivo	Cantidad
Acrilamida (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos)	19,465 g
Bis-Acrilamida (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos)	0,535 g
H ₂ O _d	a 50 ml

Tabla 9. Persulfato de amonio (10 %).

Reactivo	Cantidad
Persulfato de amonio (Bio-Rad Laboratories, Miami, Estados Unidos)	0,1 g
H ₂ O _d	1 ml

Tabla 10. Tampón TAE de corrida 1X.

Reactivo	Cantidad
Tampón TAE 50X	140 ml
H ₂ O _d	6860 ml
Volumen total	7000 ml

Tabla 11. Gel desnaturalizante (8 %).

Reactivo	40 % desnaturalizante	65 % desnaturalizante
Acrilamida-Bis (40 %) (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos)	3,6 ml	3,6 ml
Tampón TAE 50X	0,36 ml	0,36 ml
Formamida deionizada (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos)	2,16 ml	3,96 ml
Urea (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos)	2,268 g	4,158 g
H ₂ O _d	a 18 ml	a 18 ml

3.8.5 Identificación y sección de bandas desde un gel de DGGE

Las imágenes de los geles de poliacrilamida fueron capturadas con una cámara fotográfica digital (Nikon Coolpix S6300, Tokio, Japón). Las bandas obtenidas se compararon con la banda correspondiente a la cepa de referencia. Un patrón constituido por los productos de PCR de *E. faecium* DSPV 22T, *L. salivarius* DSPV 001P, *C. jejuni* C173 y *S. enteritidis* 421 fue utilizado para normalizar los geles. La similitud entre perfiles fue calculada mediante el método UPGMA empleando el programa BioNumerics versión 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Los resultados se presentaron en forma de dendrograma. Además se llevó a cabo un análisis de secuenciación. Las bandas fueron extraídas con un bisturí, eluidas en tampón TE y almacenadas durante 48 h a 4 °C para permitir la difusión del ADN. Luego fueron reamplificadas con los primers originales utilizando el protocolo descrito anteriormente. Los productos de PCR se analizaron nuevamente mediante electroforesis en un gel de agarosa 2 % para corroborar la correcta amplificación del ADN.

3.8.6 Purificación y secuenciación de los productos de PCR

El producto de PCR fue purificado con la finalidad de eliminar los cebadores y posibles dímeros de los mismos así como otros reactivos de la PCR (polimerasa, dNTPs, etc.) que podrían inhibir o dificultar la posterior reacción de secuenciación. Para la purificación se utilizó el kit Wizard SV Gel and PCR

Clean-Up System (Promega, Madison, Estados Unidos) siguiendo las indicaciones suministradas por el fabricante. La secuenciación del ADN se realizó en MACROGEN (Corea del Sur).

3.8.7 Análisis de los componentes mayoritarios de la microbiota

Con el propósito de identificar los componentes mayoritarios de la microbiota las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias de 16S ADN que se encuentran en el GenBank mediante el software BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) del NCBI (Altschul y col., 1990).

3.9 Influencia de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P liofilizada sobre la microbiota intestinal, la translocación bacteriana, la ganancia de peso y el índice de conversión de pollos parrilleros

3.9.1 Animales e instalaciones

Doscientos cuarenta pollos parrilleros de un día de vida fueron alojados en cuatro corrales de 11.328 m² cada uno, montados sobre piso de cemento cubierto por viruta de madera. Cada corral estaba a su vez dividido en dos (30 pollos/divisorio). La temperatura del galpón fue regulada a 37 °C mediante el encendido de campanas y el empleo de cortinas, y los animales fueron alimentados con concentrado comercial sin medicamentos y agua. El ensayo fue realizado en la Unidad Didáctico-Productiva de la FCV-UNL. Hasta el día 28 de la crianza, se administró un alimento concentrado peleteado comercial iniciador (Avigan, Humboldt, Argentina), mientras que a partir del día 28 y hasta la finalización del ensayo, se suministró un alimento concentrado peleteado comercial terminador (Avigan, Humboldt, Argentina). La fórmula del concentrado comercial se describe en la tabla 2.

3.9.2 Microorganismos

Para el estudio se utilizó la cepa bacteriana de origen aviar *L. salivarius* DSPV 001P resistente a rifampicina.

3.9.3 Preparación y administración del inóculo

La cepa resistente fue descongelada a temperatura ambiente. Se realizaron dos pases en caldo MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), los cuales fueron incubados a 37 °C durante 18 h en estufa en atmósfera convencional. En el proceso de fermentación en feedbatch se empleó permeado de suero de queso al 6% (Arla Food Ingredients, Porteña, Argentina), extracto de levadura al 0,8%, 0,003 g/l de sulfato de manganeso (Merck, Darmstadt, Alemania) y 20 g/l de peptona de caseína (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos) como medio de cultivo. Se utilizó un fermentador tipo tanque agitado BIOSTAT A (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Reino Unido) empleando un volumen de trabajo de 4 l, con 2 % de inóculo inicial. La agitación se fijó en 120 rpm y la temperatura a 37 °C, mientras que el pH fue regulado a 6. Luego de 6 h de incubación, se agregaron 200 ml de permeado de suero de queso al 15 % (Arla Food Ingredients, Porteña, Argentina) y 200 ml de peptona de caseína al 10% (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos). La incubación se realizó durante 18 h. Al final de la producción de biomasa el cultivo fue enfriado y luego centrifugado a 5000 g durante 10 min a 17 °C. El sobrenadante fue descartado y el pellet lavado dos veces con PBS. El pellet se resuspendió en leche descremada estéril al 6 % (Corlasa, Esperanza, Argentina). La suspensión se congeló a -80 °C por 18 h y luego fue liofilizada a 0,044 mbar durante 27 h. La concentración bacteriana se calculó mediante la determinación del número de UFC. El polvo liofilizado obtenido fue administrado a los pollos con el alimento concentrado. El microorganismo fue suministrado durante los 42 d que duró el experimento en una dosis no menor a 1×10^9 UFC/pollo.

3.9.4 Diseño del experimento

El tratamiento consistió en la administración de la cepa *L. salivarius* DSPV001P resistente a rifampicina durante todo el período de crianza de los pollos. Los animales se dividieron en dos grupos experimentales de 120 ejemplares cada uno, homogéneos en su peso: G-C y G-P. El cuidado de los animales se realizó teniendo en cuenta la Guía para el Cuidado y Uso de Animales en Investigación y Enseñanza (FASS, 1998). Los procedimientos utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética y Seguridad de la FCV-

UNL. El ensayo se realizó en ocho réplicas. Las variables calculadas semanalmente fueron: peso, consumo de alimento, eficiencia de conversión alimenticia, recuento de BAL resistentes a rifampicina, BAL totales, enterobacterias, *E. coli* y levaduras en buche, ciego e hígado. El consumo de alimentos fue calculado en base al consumo de alimento concentrado peleado comercial. La ganancia de peso vivo fue obtenida por diferencia entre pesos en el período de tiempo correspondiente. La conversión alimenticia fue calculada relacionando el consumo de alimentos y la ganancia de peso vivo.

3.9.5 Normas de bioseguridad

Un conjunto de prácticas de manejo fueron diseñadas para prevenir la entrada, transmisión y diseminación de la cepa probiótica al G-C. En líneas generales, se contempló la utilización de mamelucos y calzado descartable diferentes para el G-P y el G-C, la aplicación de un desinfectante en spray antes de ingresar y al salir de cada grupo, la colocación de bandejas con cal en las puertas de entrada a cada box, la prohibición del ingreso de visitas y personal ajeno al ensayo, y la adecuada disposición de los cadáveres en fosas para depósito.

3.9.6 Necropsias

Cada 7 d se realizó la necropsia programada mediante dislocación cervical de un animal en cada réplica (8 pollos totales). Las necropsias se realizaron a las 24 h después de la última administración del probiótico. Se recolectaron los siguientes órganos para análisis microbiológicos: hígado, buche y ciego, en esta secuencia utilizando instrumental estéril en cada tejido para minimizar la posibilidad de contaminación bacteriana entre muestras (Lee y col., 2000).

3.9.7 Recuperación del inóculo

Las muestras de ciego y buche recogidos fueron diluidas 1/10 en solución Ringer ¼ (Biokar, Beauvais, Francia) y disgregadas en un vórtex. A partir de las diluciones seriadas de cada muestra se sembraron, placas de agar MRS pH 6,2 ± 0,2 (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) para contar la flora láctica total y placas de agar MRS_{rif} para recuperar solamente el inóculo utilizado. Las placas

de Petri fueron incubadas a 37 °C en condiciones de anaerobiosis, y luego de 72 h se realizó el recuento del número de UFC/g para cada grupo bacteriano. Las diluciones fueron además sembradas en placas conteniendo HyL (Britania, Buenos Aires, Argentina), e incubadas a 37 °C durante 48 h en aerobiosis para el recuento de levaduras. A su vez, se sembraron placas con VRBG (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y TBX (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), las mismas fueron incubadas a 37 y 44 °C durante 24 h en aerobiosis para el recuento de coliformes fecales y *E. coli*, respectivamente.

3.9.8 Prueba de translocación

Los trozos de hígado fueron homogeneizados con un Stomacher 80 Biomaster (Seward, Worthing, Reino Unido) en solución Ringer ¼ (Biokar, Beauvais, Francia). Para medir la translocación los homogenatos fueron sembrados en los siguientes medios: MRS_{rif} para el recuento de la cepa administrada, MRS para BAL (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), HyL para levaduras (Britania, Buenos Aires, Argentina), VRBG para enterobacterias (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y TBX para *E. coli* (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido).

3.9.9 Aislamiento de *Campylobacter* termotolerantes

En los muestreos correspondientes al d 0, 7 y 14, se tomaron 0,2 g de contenido del ciego de pollos parrilleros y se transfirieron a un tubo de 4 ml de Caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Los tubos se cultivaron en condiciones de microaerofilia (10% de O₂, 5% de CO₂ y 85% de N₂) a 42 °C durante 24 h. Transcurrido ese lapso de tiempo, los tubos se centrifugaron a 5000 *g* durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y cada sedimento se colocó sobre filtros de 0,45 µm (hasta tres filtros por placa) en placas de agar modificado con carbón vegetal, cefoperazona y deoxicolate (mCCDA). A partir del d 21 se procedió de manera diferente: se colocaron filtros de 0,45 µm estériles sobre placas de mCCDA, y sobre cada filtro se dispuso 1 g de contenido del ciego de cada pollo (extraído con pinzas y tijeras previamente flameadas). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 10 min. Posteriormente, los filtros fueron retirados y las placas incubadas a 42 °C en condiciones de microaerofilia (10% de O₂, 5% de CO₂ y 85% de N₂) durante 48 h. Las colonias presuntivas de *Campylobacter* termotolerantes fueron

observadas al microscopio de contraste de fases, a partir de un fresco. Al confirmarse la presencia de *Campylobacter* termotolerantes, se repicaron a otra placa de mCCDA para obtener colonias puras y se incubaron 48 h a 42 °C en condiciones de microaerofilia (10% de O₂, 5% de CO₂ y 85% de N₂). El día 42 se realizaron hisopados cloacales de 40 pollos (5 pollos de cada réplica). Cada hisopo fue colocado en un tubo de 4 ml de Caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y transportado al laboratorio. Los procedimientos utilizados fueron los mismos que se emplearon durante los primeros 14 d de ensayo.

3.9.10 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media aritmética y sus DS. Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados mediante el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), implementándose ANOVA y Test de medidas repetidas. En tanto, la mortandad y la translocación microbiana se analizaron mediante el test de chi cuadrado o test exacto de Fisher.

3.10 Monitoreo de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P mediante tinción con isotiocianato de fluoresceína

3.10.1 Preparación de las bacterias fluorescentes

Cultivos frescos de *L. salivarius* DSPV 001P resistente a rifampicina fueron centrifugados (5.000 g, 10 min, 17 °C) y se lavaron 2 veces con tampón PBS para resuspenderse en el volumen de partida. Las suspensiones celulares fueron adicionadas con 1mg/ml de FITC (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos), y se incubaron durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados y lavados 6 veces con tampón PBS hasta la eliminación completa del agente fluorescente. El sedimento se resuspendió en PBS a una concentración final de 10^{9.5} UFC/ml (Medici y col., 2004; Burns, 2012).

3.10.2 Diseño del experimento

Cuarenta y cinco pollos parrilleros en su primer día de vida fueron divididos en 5 grupos experimentales conformados por 9 animales cada uno: un grupo control (G-C) y cuatro grupos probióticos (G-P), a los cuales se les suministró la

cepa en diferente concentración. Los pollos recibieron un volumen de 3,16 ml *per os* para alcanzar una concentración de 10 Log UFC, y de 1 ml para llegar a las concentraciones restantes: 9,5 Log UFC; 8,5 Log UFC y 7,5 Log UFC. Al G-C se le suministró 1 ml de PBS como placebo.

3.10.3 Necropsias

Tres pollos pertenecientes a cada grupo (15 pollos totales) se sacrificaron por dislocación cervical luego de 30 min, 6 h o 12 h de recibir las bacterias marcadas. Se tomaron asépticamente muestras de hígado, buche, duodeno, ciego y bolsa de Fabricio.

3.10.4 Pruebas microbiológicas

Muestras de 0,1 g de mucosa del buche, contenido de buche, duodeno, ciego y bolsa de Fabricio fueron diluidas 1/10 en solución Ringer $\frac{1}{4}$ (Biokar, Beauvais, Francia). Luego se efectuaron diluciones decimales seriadas y a partir de éstas, la siembra en placas con medio MRS_{rif} (100 µg/ml) para recuperar solamente la BAL administrada. Las placas de Petri fueron incubadas a 37 °C en anaerobiosis y pasadas 72 h se contaron las colonias características.

3.10.5 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media aritmética y sus DS. Las diferencias entre tratamientos se evaluaron utilizando un modelo lineal generalizado con las dosis (10 Log UFC; 9,5 Log UFC; 8,5 Log UFC; 7,5 Log UFC y GC), el tiempo (30 min, 6 h, y 12 h), y la sección del TGI (buche, duodeno, ciego y bolsa de Fabricio) como variables independientes. Los resultados se procesaron mediante el programa INFOSAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

3.10.6 Cuantificación de fluorescencia en tejidos y contenido gastrointestinal

Muestras de 0,1 g de mucosa del buche, contenido de buche, duodeno, ciego y bolsa de Fabricio de los G-P y el G-C fueron colocadas en una microplaca negra (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania) y leídas en un lector

multimodal de microplacas (Sinergy HT, Bio-Tek, Winooski, Estados Unidos). Para cuantificar las unidades de fluorescencia relativa (UFR) se empleó el software Gen5 versión 2.01 para Windows, utilizando una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm (Tellez y col., 2015). La fluorescencia se determinó haciendo una lectura en la parte superior del pocillo, con una ganancia de 35 y una agitación previa de 3 s. Para estimar la cantidad de bacterias marcadas en las muestras a través de la fluorescencia emitida se realizaron curvas de correlación de fluorescencia en función de los recuentos obtenidos en placa. Un análisis de regresión se llevó a cabo con el fin de observar la relación entre las variables: fluorescencia (UFR) y (recuentos microbiológicos) (UFC/0,1g). Cuando los resultados de UFR o los recuentos microbiológicos fueron cero, los datos se excluyeron para poder relacionar las variables.

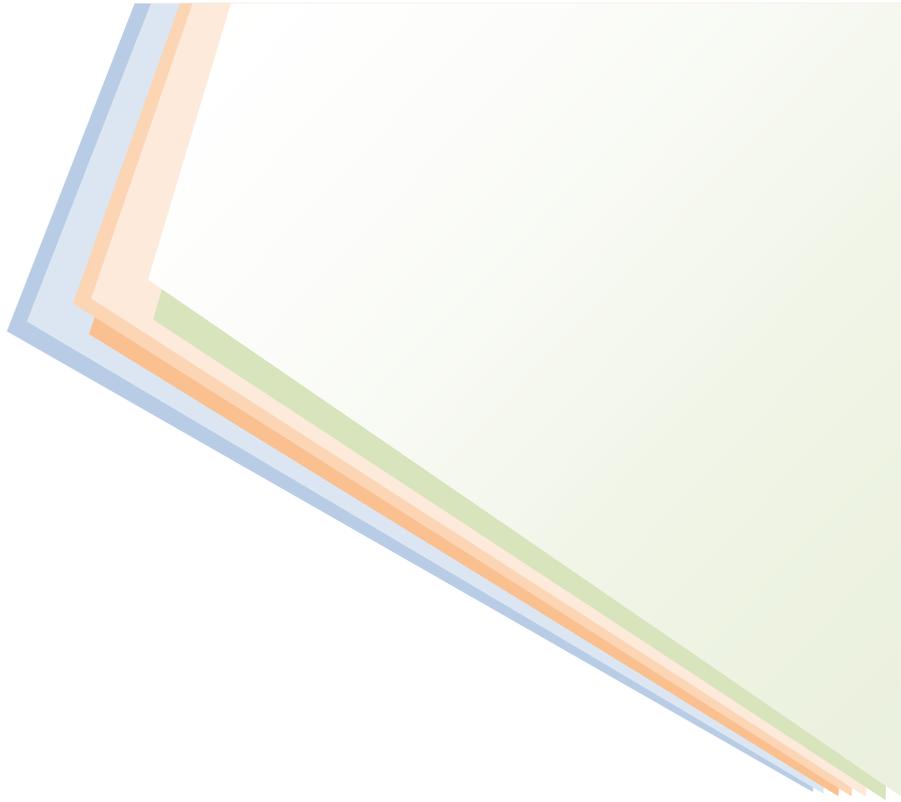
3.10.7 Prueba de translocación

Para evaluar la translocación de la BAL, trozos de 0,1 g de hígado obtenidos en condiciones asépticas fueron diluidos 1/10 en solución Ringer $\frac{1}{4}$ (Biokar, Beauvais, Francia). Para medir la translocación de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P, el homogenato fue sembrado en MRS_{rif} (100 μ g/ml). Transcurrido el período de incubación se procedió al recuento del número de células viables. A su vez, muestras de 0,1 g de hígado de los G-P y el G-C fueron colocadas en una microplaca negra (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania) y leídas en el lector multimodal de microplacas (Sinergy HT, Bio-Tek, Winooski, Estados Unidos). La lectura se llevó a cabo con el mismo procedimiento empleado para las muestras huecas del tracto digestivo.

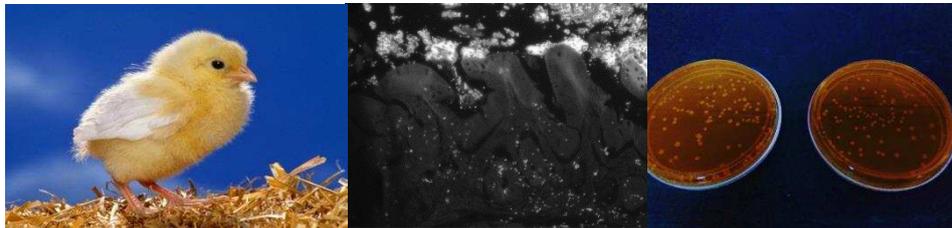
3.10.8 Detección de bacterias marcadas fluorescentes en cortes histológicos

Muestras de buche, duodeno, ciego, bolsa de Fabricio e hígado fueron procesadas mediante la técnica histológica de Saint Marie (1962), con algunas modificaciones. Inicialmente, muestras de 1 x 1 cm en órganos huecos y de 1 x 1 x 0,3 cm en hígado se retiraron con tijeras y pinzas de disección. A continuación, las muestras se sumergieron en alcohol 70 %, se almacenaron durante la noche bajo refrigeración, y se redujeron a 0,5 x 0,5 cm. Con un

micrótomo (Leica RM2245, Nussloch, Alemania) se realizaron secciones de 5 μm de espesor. Los cortes histológicos se desparafinaron en un gradiente de xilenos/alcoholes. El monitoreo y la interacción de las bacterias marcadas con FITC fue realizada bajo luz azul en un microscopio de fluorescencia (objetivo 40x) (Eclipse CI, Nikon, Tokio, Japón), usando filtro excitador 450~480 nm, filtro barrera 515 nm y espejo dicroico 505 nm (Heo y Song, 2011). Las imágenes fueron tomadas con una cámara fotográfica digital (DCM900, ScopeTek, Hangzhou, China) empleando el software de captura Minisee versión 1.1.3.0 para Windows.



4. RESULTADOS



4.1 Evaluación de la leche como medio de crecimiento de cepas probióticas aviares

Luego de 72 h de incubación en leche, no hubo diferencias significativas en el crecimiento ($P=0,381$) entre las tres cepas: *L. salivarius* DSPV 001P (8,03 Log UFC/ml), *L. agilis* DSPV 004P (7,91 Log UFC/ml) y *L. salivarius* DSPV 003P (7,83 Log UFC/ml). Los recuentos obtenidos fueron mayores al utilizar MRS ($P<0,001$), con un promedio de 8,85 Log UFC/ml para la cepa *L. salivarius* DSPV 001P; 8,76 Log UFC/ml para *L. agilis* DSPV 004P y 8,53 Log UFC/ml para *L. salivarius* DSPV 003P.

4.2 Influencia de la suplementación con BAL de origen aviar sobre la microbiota intestinal y la translocación bacteriana en pollos parrilleros

Los recuentos efectuados en medio MRS evidenciaron ausencia de crecimiento de las BAL a partir de muestras de hígado de los pollos tratados. Por otra parte, se obtuvo un alto grado de recuperación de las cepas probióticas desde buche y ciego. En el grupo control se observó ausencia de crecimiento de la microbiota láctica en muestras de hígado y TGI.

La colonización de ciego (Figura 5) y buche (Figura 6) fue significativamente mayor a lo largo de los 2 muestreos ($P<0,001$) para la cepa *L. salivarius* DSPV 001P. En ciego, a las 24 h la carga bacteriana fue de $5,02\pm 0,66$ Log UFC/ciego para *L. salivarius* DSPV 001P, $4,32\pm 0,51$ Log UFC/ciego en el caso de *L. agilis* DSPV 004P y $3,69\pm 0,55$ Log UFC/ciego para *L. salivarius* DSPV 003P. En buche, la carga microbiana fue de $6,87\pm 0,94$ Log UFC/buche para *L. salivarius* DSPV 001P, $4,80\pm 0,41$ Log UFC/buche en el caso de *L. agilis* DSPV 004P y $4,52\pm 0,11$ Log UFC/buche para *L. salivarius* DSPV 003P. Por otra parte, en ciego, a las 72 h la carga bacteriana fue de $5,79\pm 0,22$ Log UFC/ciego para *L. salivarius* DSPV 001P, $3,39\pm 0,55$ Log UFC/ciego para *L. salivarius* DSPV 003P y $2,10\pm 2,97$ Log UFC/ciego en el caso de *L. agilis* DSPV 004P. En buche, la carga microbiana fue de $6,71\pm 0,29$ Log UFC/buche para *L. salivarius* DSPV 001P, $5,06\pm 0,96$ Log UFC/buche en el caso de *L. agilis* DSPV 004P y $3,59\pm 0,16$ Log UFC/buche para *L. salivarius* DSPV 003P.

Figura 5. Recuperación de las cepas *L. salivarius* DSPV 001P, *L. salivarius* DSPV 003P y *L. agilis* DSPV 004P desde el ciego de los pollos tratados 24 h post administración.

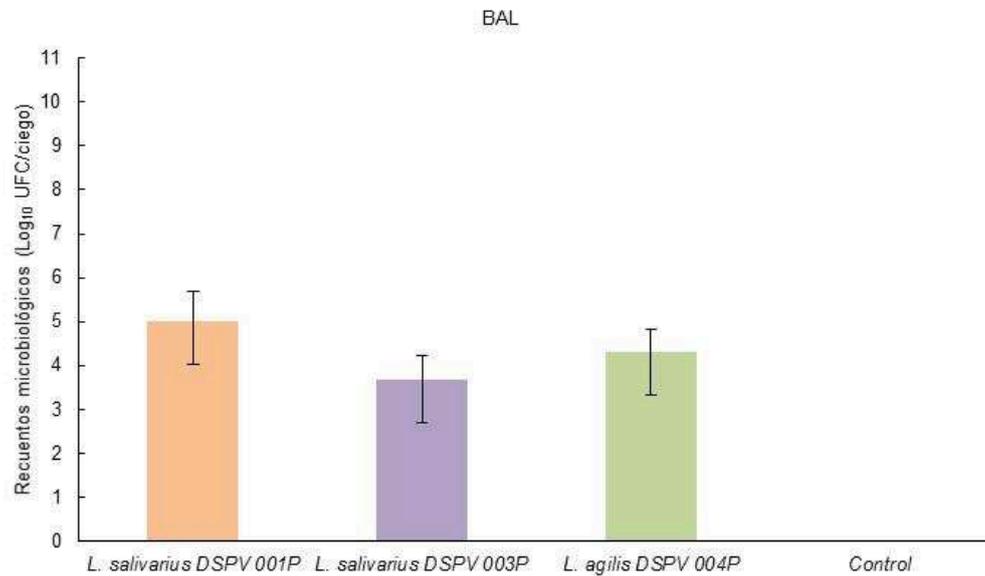
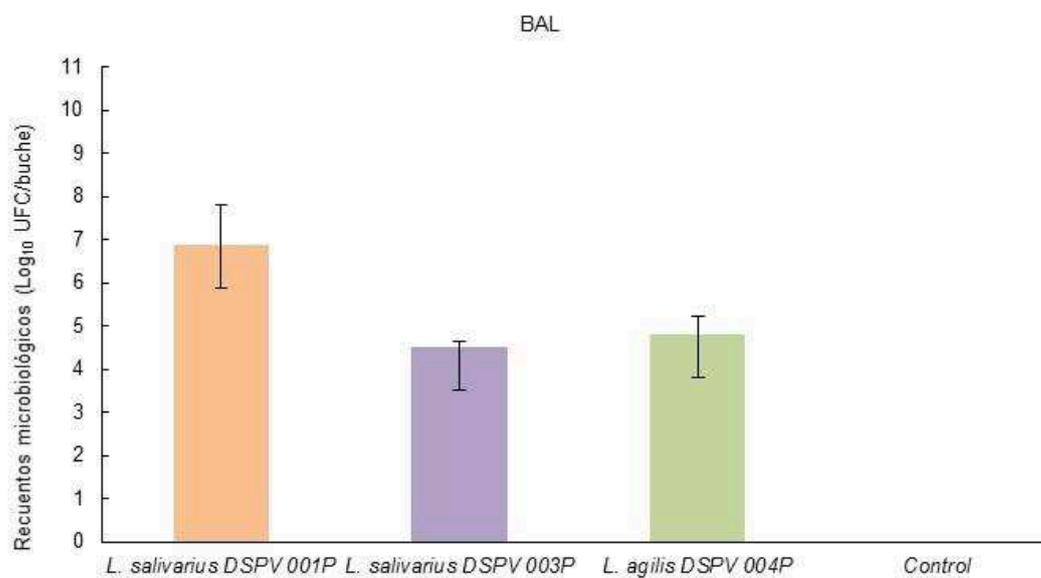


Figura 6. Recuperación de las cepas *L. salivarius* DSPV 001P, *L. salivarius* DSPV 003P y *L. agilis* DSPV 004P desde el buche de los pollos tratados 24 h post administración.



No se encontraron diferencias significativas en el recuento de enterobacterias entre los grupos tratados y el control procedentes de ciego ($P=0,092$) y buche ($P=0,136$) (Figuras 7 y 8). Asimismo, la suplementación con las cepas probióticas tampoco modificó el número de coliformes entre los grupos tratados y el control (ciego $P=0,113$; buche $P=0,126$) (Figuras 9 y 10). No hubo translocación de estas poblaciones microbianas al hígado de los pollos sacrificados.

Figura 7. Recuento de enterobacterias procedentes del ciego de pollos tratados y controles.

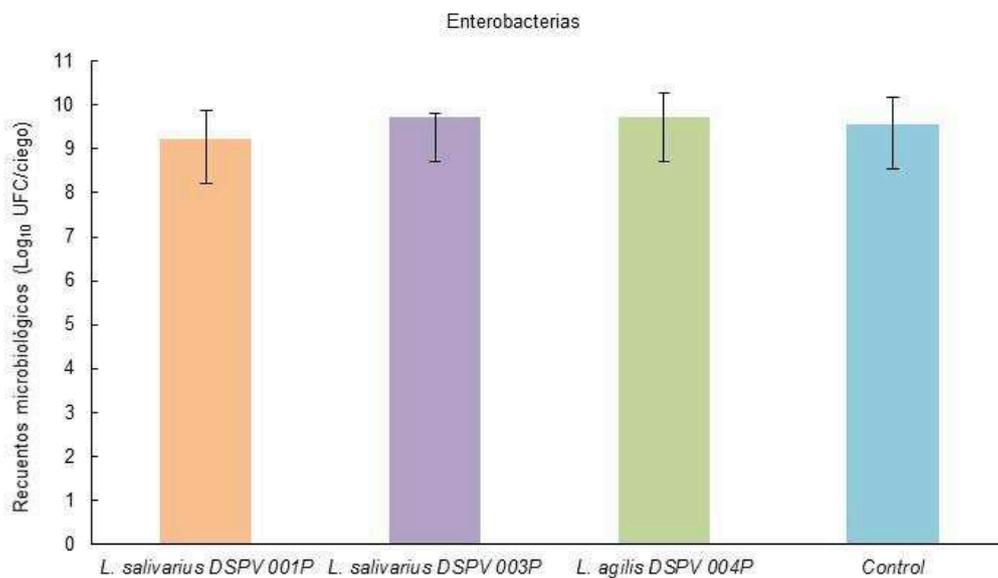


Figura 8. Recuento de enterobacterias procedentes del buche de pollos tratados y controles.

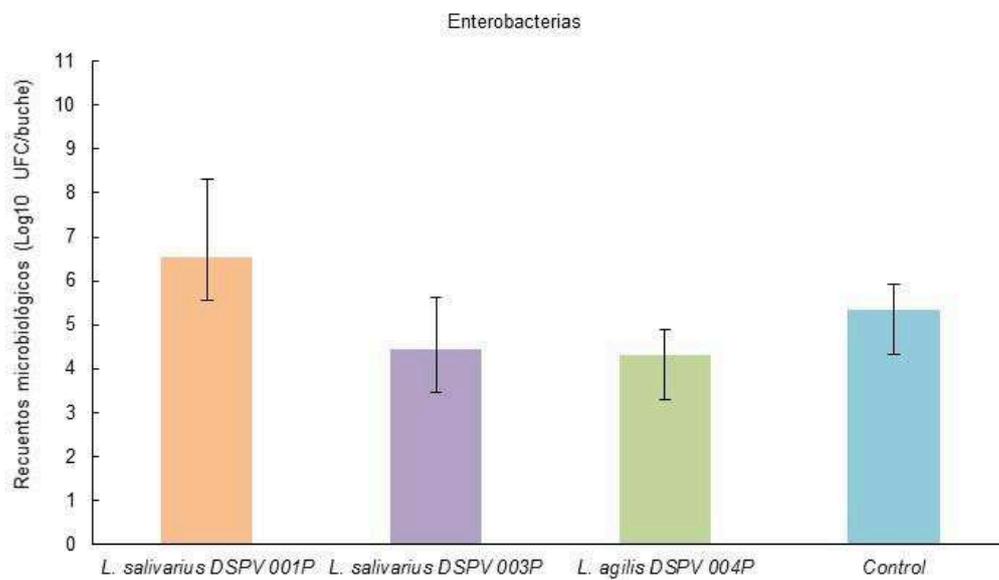


Figura 9. Recuento de coliformes desde el ciego de pollos tratados y controles.

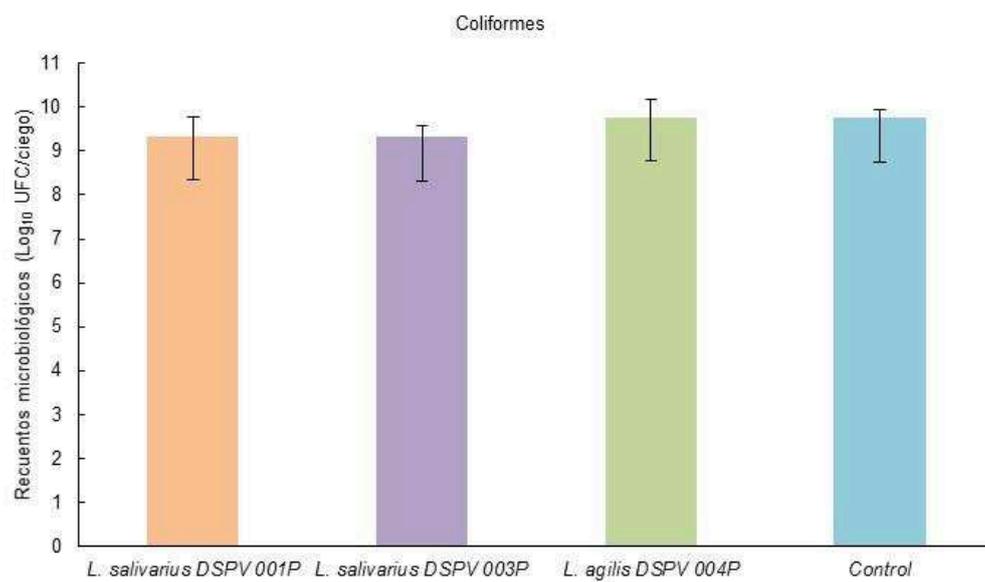
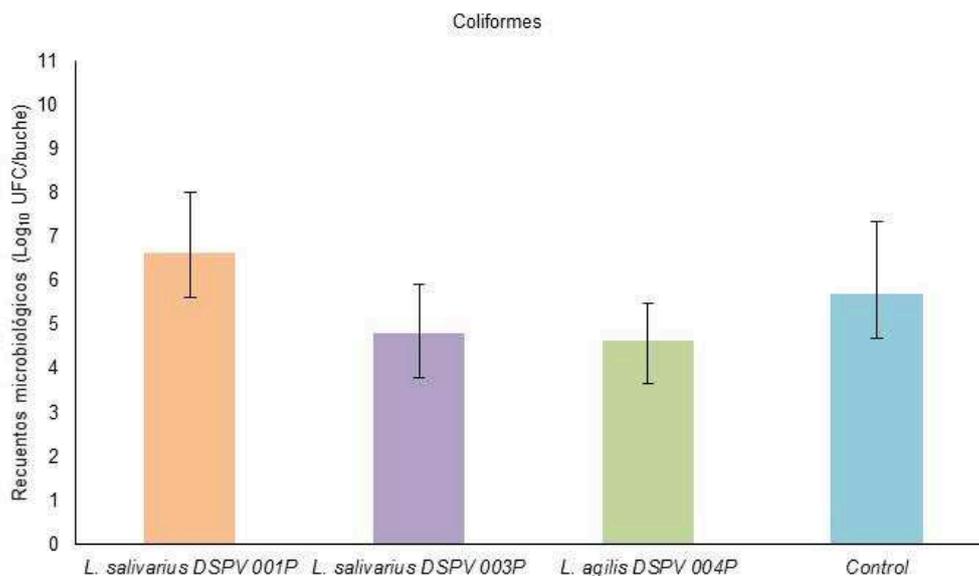


Figura 10. Recuento de coliformes desde el buche de pollos tratados y controles.



4.3 Influencia de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P sobre la microbiota intestinal, la translocación bacteriana, la ganancia de peso y el índice de conversión de pollos parrilleros

Los recuentos efectuados en medio MRS evidenciaron ausencia de crecimiento de la BAL en el hígado de los pollos tratados. Por otra parte, la cepa probiótica se recuperó desde buche y ciego a lo largo de todos los muestreos (Tabla 12 y 13). En el grupo control se observó ausencia de crecimiento de microbiota láctica en hígado y TGI. No se encontraron diferencias significativas en el recuento de coliformes entre los grupos tratados y control procedentes de ciego ($P=0,064$) y buche ($P=0,064$) (Tabla 12 y 13). No hubo diferencias significativas en longitud de ciego ($P=0,493$), peso de bazo ($P=0,919$) y bolsa de Fabricio ($P=0,893$). No se hallaron diferencias significativas en el número de enterobacterias en ciego y buche.

Tabla 12. Microbiota del buche de pollos parrilleros suplementados con *L. salivarius* DSPV 001P (G-P) y no suplementados (G-C) durante 6 semanas de experimentación.

Tratamiento	Día	<i>L. salivarius</i> DSPV 001P (Log UFC/pollo)	Enterobacterias (Log UFC/pollo)	Coliformes (Log UFC/pollo)
G-P	1	5,45	3,52	3,64
	7	1,19	2,70	3,36
	14	1,57	4,27	5,16
	21	1,95	5,27	5,10
	28	0,63	5,07	5,26
	35	2,21	4,54	5,59
	42	5,45	3,52	3,64
G-C	1	0,00	5,26	5,27
	7	0,00	3,24	0,30
	14	0,00	6,01	6,23
	21	0,00	4,64	4,70
	28	0,00	6,06	5,59
	35	0,00	6,44	6,44
	42	0,00	5,26	5,27

Tabla 13. Microbiota del ciego de pollos parrilleros suplementados con *L. salivarius* DSPV 001P (G-P) y no suplementados (G-C) durante 6 semanas de experimentación.

Tratamiento	Día	<i>L. salivarius</i> DSPV 001P (Log UFC/pollo)	Enterobacterias (Log UFC/pollo)	Coliformes (Log UFC/pollo)
G-P	1	4,84	8,41	8,82
	7	1,58	6,93	6,77
	14	2,13	9,07	8,93
	21	4,10	8,93	8,22

	28	3,14	7,03	5,69
	35	2,70	7,56	7,43
	42	4,84	8,41	8,11
G-C	1	0,00	7,36	8,11
	7	0,00	7,32	5,39
	14	0,00	7,87	7,14
	21	0,00	4,93	7,36
	28	0,00	6,85	7,77
	35	0,00	7,77	8,82
	42	0,00	7,36	6,77

El peso de los pollos parrilleros fue incrementando paulatinamente a lo largo del ensayo. Esto estuvo directamente relacionado con el aumento sostenido del consumo de alimentos a medida que los animales iban creciendo. El consumo pasó de $170 \pm 0,015$ g/pollo a $1315 \pm 0,054$ g/pollo en el G-P y de $169 \pm 0,009$ g/pollo a $1414 \pm 0,017$ g/pollo en el G-C entre la primera y última semana del ensayo. No hubo diferencias significativas en el consumo entre ambos grupos ($P=0,156$). En lo que respecta a ganancia de peso y eficiencia de conversión alimenticia, no hubo diferencias significativas entre los grupos ($P=0,165$ y $P=0,373$, respectivamente) (Tabla 14). Los valores de conversión alimentaria muestran que los animales del G-P fueron capaces de aumentar 1 kg su peso corporal por cada 1,62 kg de alimento consumido, mientras que los del G-C aumentaron 1 kg por cada 1,66 kg de alimento consumido.

Tabla 14. Performance de crecimiento en pollos parrilleros suplementados con *L. salivarius* DSPV 001P (G-P) y no suplementados (G-C) durante 6 semanas de experimentación.

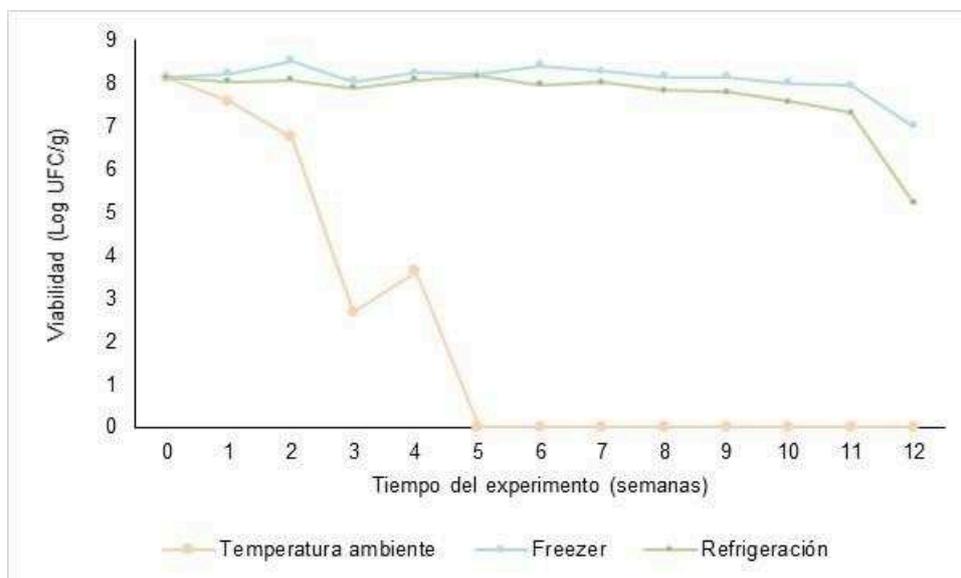
Tratamiento	Día	Peso (g)	Consumo (g/pollo/semana)	Eficiencia de conversión
G-P	0	42,55		
	7	167,28	170	1,36

	14	446,27	360	1,29
	21	898,94	677	1,50
	28	1532,05	921	1,45
	35	2011,81	1089	2,27
	42	2717,85	1315	1,86
G-C	0	42,85		
	7	167,09	169	1,36
	14	480,85	408	1,30
	21	936,23	695	1,53
	28	1536,47	979	1,63
	35	1989,07	1102	2,43
	42	2810,02	1414	1,72

4.4 Conservación de *L. salivarius* DSPV 001P de origen aviar mediante liofilización

La viabilidad de la cepa no se redujo luego del proceso de liofilización pero varió con la temperatura de conservación del polvo liofilizado ($P < 0,001$). Así, la mayor viabilidad del liófilo se obtuvo en las muestras conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, con recuentos de $8,3 \pm 0,05$ Log UFC/g a los 12 meses. A $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ se observó una menor viabilidad, con recuentos de $5,2 \pm 0,17$ Log UFC/g a las 12 semanas. Sin embargo, la concentración celular permaneció en valores superiores al Nivel Mínimo Recomendado (NMR) de 6 Log UFC (Vinderola y col., 2000) hasta las 11 semanas del experimento. A temperatura ambiente la cepa registró la mayor pérdida de viabilidad, con recuentos de $3,6 \pm 0,25$ Log UFC/g el día 28 y pérdida absoluta de la viabilidad en el día 35 (Figura 11).

Figura 11. Viabilidad de *L. salivarius* DSPV 001P durante 12 semanas a diferentes temperaturas.



4.5 Colonización de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P liofilizada en el TGI de pollos parrilleros

Al día 0, no se detectaron bacterias resistentes a rifampicina en las muestras provenientes de ciego y buche. Se obtuvo un alto grado de recuperación de la cepa probiótica 48 h post administración, con recuentos de $4,97 \pm 0,3$ Log UFC en ciego y $3,73 \pm 1,88$ Log UFC en buche. Transcurridos 16 d de suplementación, el recuento aumentó a $7,41 \pm 0,35$ Log UFC/ciego y $7,87 \pm 0,44$ Log UFC/buche. La cepa pudo recuperarse durante 28 d luego del cese de la suplementación. Al día 45, el recuento fue de $6,22 \pm 2,26$ Log UFC/ciego y $6,75 \pm 1,67$ Log UFC/buche (Figuras 12 y 13).

Figura 12. Recuperación *L. salivarius* DSPV 001P desde el ciego de pollos parrilleros suplementados durante 16 d.

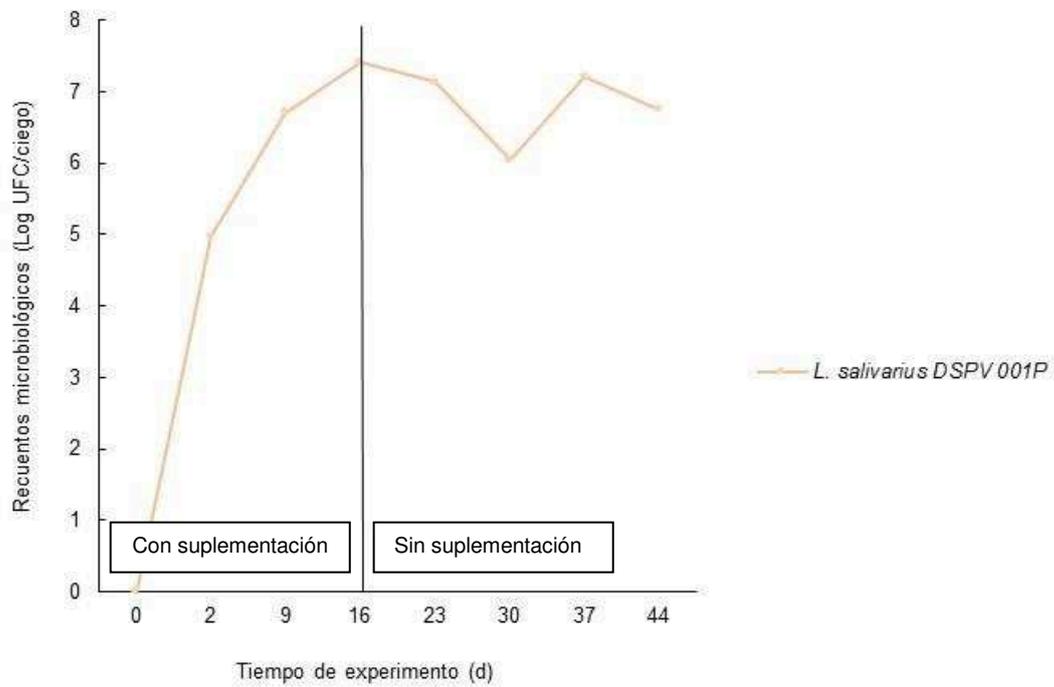
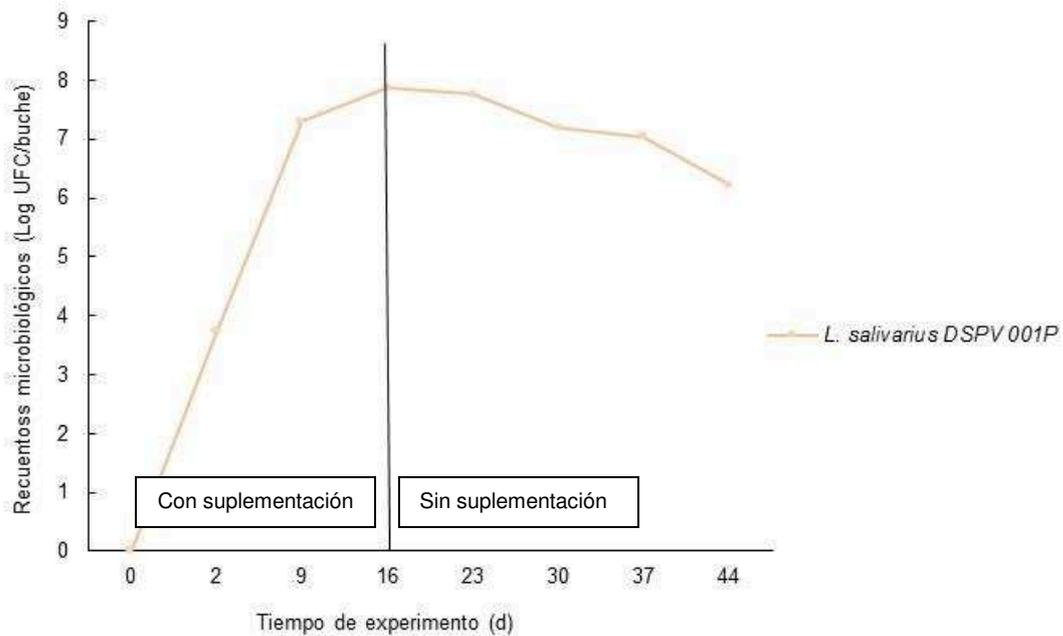


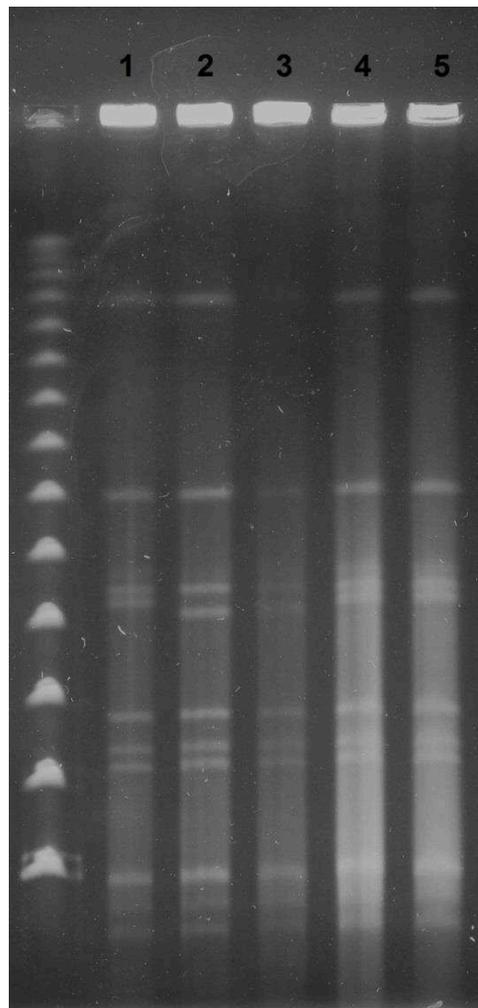
Figura 13. Recuperación de *L. salivarius* DSPV 001P desde el buche de pollos parrilleros suplementados durante 16 d.



4.6 Monitoreo de las cepas recuperadas desde el TGI mediante electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE)

Se observó una similitud del 100 % entre las cepas en estudio. Las mismas presentaron el mismo número de bandas y el mismo tamaño (Figura 14).

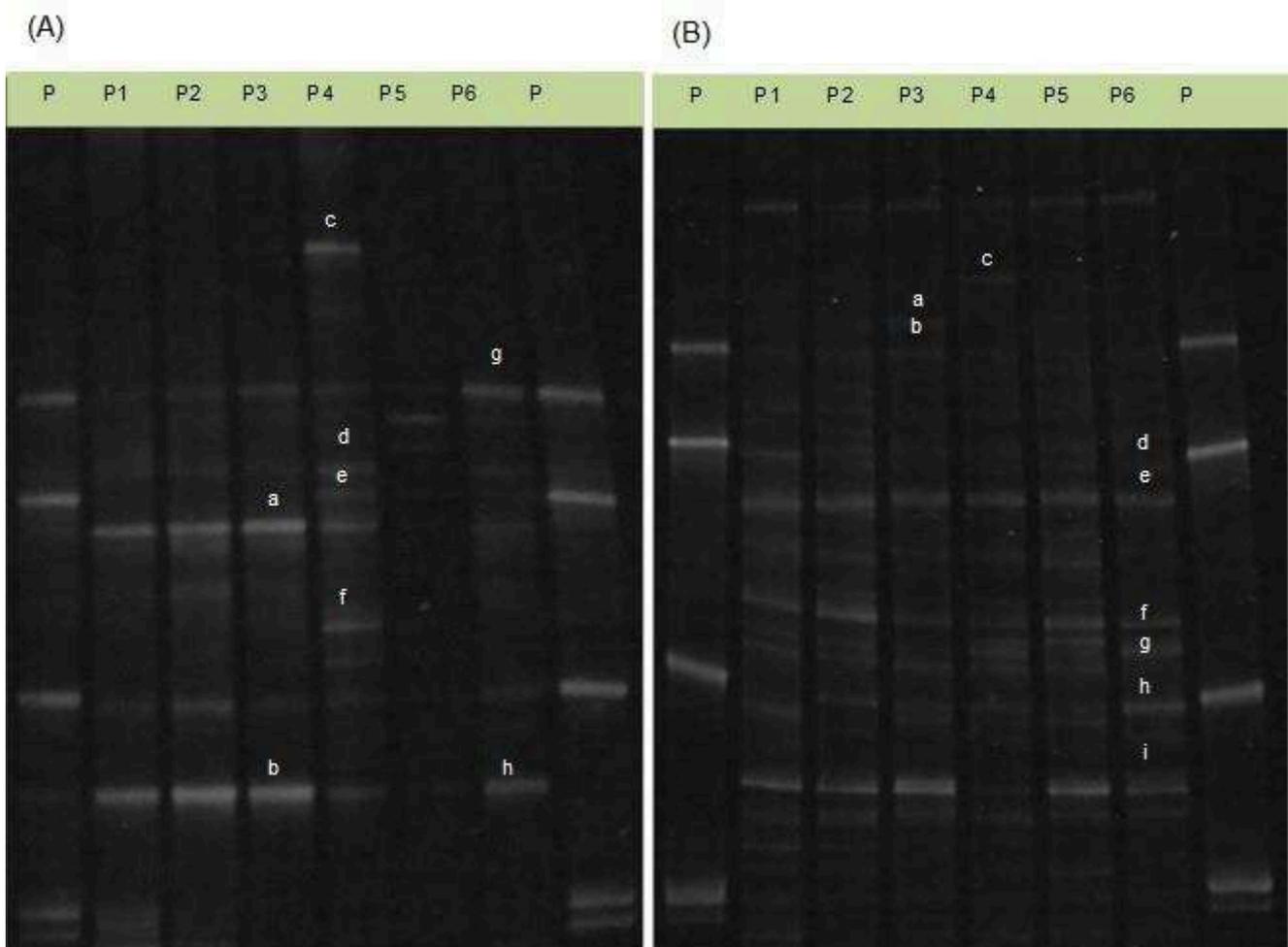
Figura 14. Perfiles electroforéticos obtenidos por PFGE de las cepas (1) *L. salivarius* DSPV 001P wildtype, (2) *L. salivarius* DSPV 001P resistente al antibiótico rifampicina, (3) *L. salivarius* DSPV 001P liofilizada, (4) *L. salivarius* DSPV 001P recuperada de buche y (5) *L. salivarius* DSPV 001P recuperada de ciego. La restricción del ADN genómico se realizó empleando la enzima *Sma*I. El marcador de peso molecular utilizado fue Lambda Ladder PFGE Marker (New England Biolabs, Ipswich, Estados Unidos).

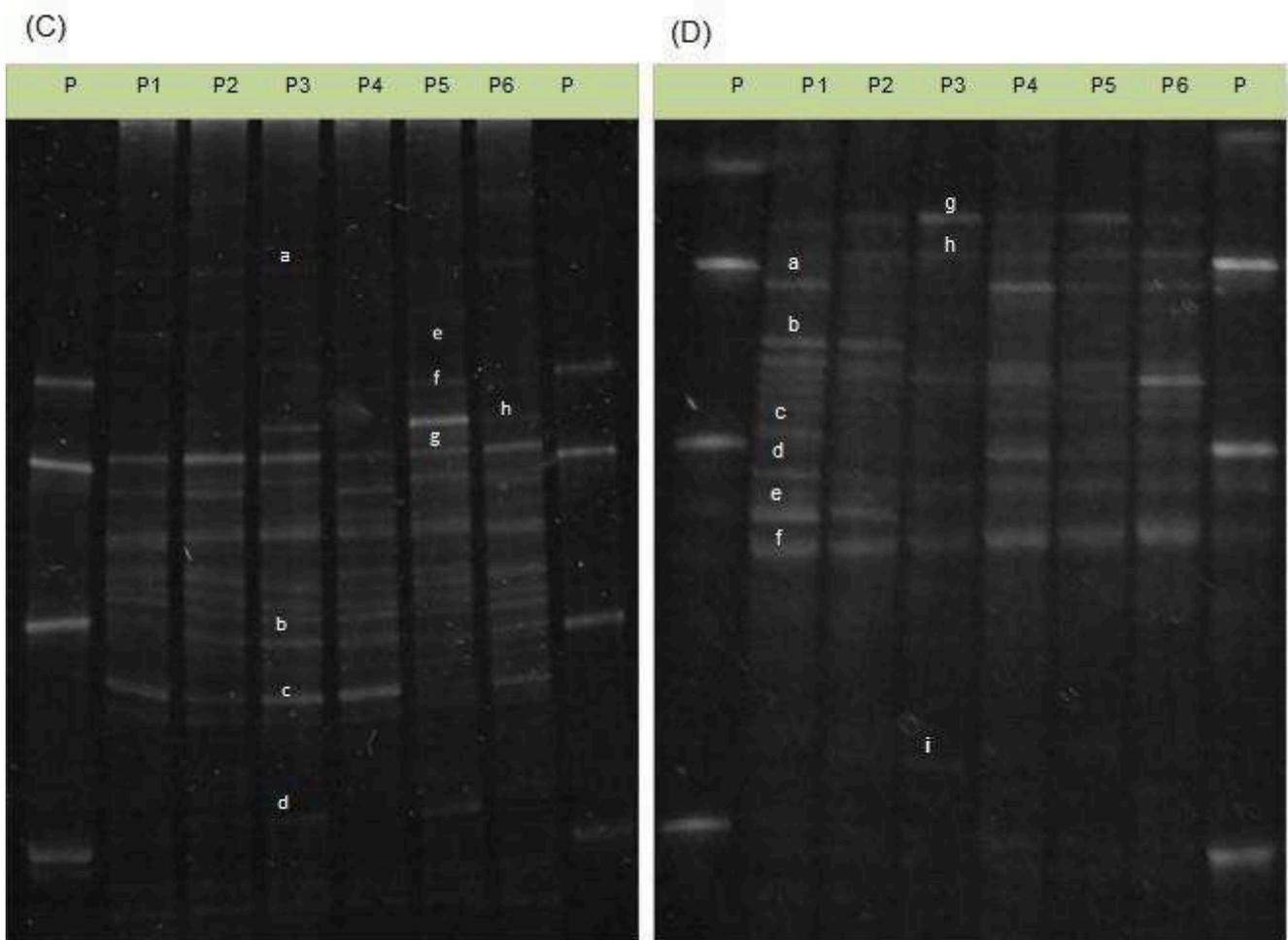


4.7 Análisis de la dinámica poblacional de la microbiota predominante del ciego de pollos parrilleros

Los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana del ciego de los pollos tratados durante 16 d con la cepa *L. salivarius* DSPV 001P arrojaron patrones compuestos por 5 a 16 bandas dependiendo de la muestra analizada. Un mayor número de bandas fue resuelto en la parte media del gel en comparación con la parte superior e inferior del mismo. El número de bandas discernibles por muestra aumentó del día 1 al día 30 para luego disminuir progresivamente. Muchas bandas dominantes desaparecieron después de unos días y fueron sustituidas por otras (Figura 15). Se encontró una similitud del 40 % en los perfiles de la microbiota cecal de pollos parrilleros de 1 d de vida. A los 15 d, los ciegos de los pollos tuvieron coeficientes de similitud de la microbiota del 80 %. En tanto, las muestras de ciego presentaron un coeficiente de similitud del 60 % a los 30 días. Una relación similar en los perfiles DGGE se observó en muestras provenientes de pollos de 45 d de edad.

Figura 15. DGGE de ADN extraído del ciego de pollos tratados durante 16 d con la cepa *L. salivarius* DSPV 001P. (A) día 1, (B) día 15, (C) día 30, (D) día 45, (P) patrón con bacterias de referencia (de arriba a abajo del gel: *E. faecium* DSPV 22T, *L. salivarius* DSPV 001, *C. jejuni* C173 y *S. enteritidis* 421).





Un total de 34 bandas fueron escindidas y enviadas a secuenciar, las cuales presentaron entre 83 % y 100 % de identidad con las secuencias de ADNr 16S disponibles en el GenBank para su identificación (Tabla 15). Se encontraron bandas en igual posición en todas las muestras de pollos parrilleros de la misma edad (Figura 16). La intensidad de las mismas fue variable, determinando esto que la abundancia de los microorganismos era diferente.

Figura 16. Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana del ciego de los pollos tratados durante 16 d con la cepa *L. salivarius* DSPV 001P.

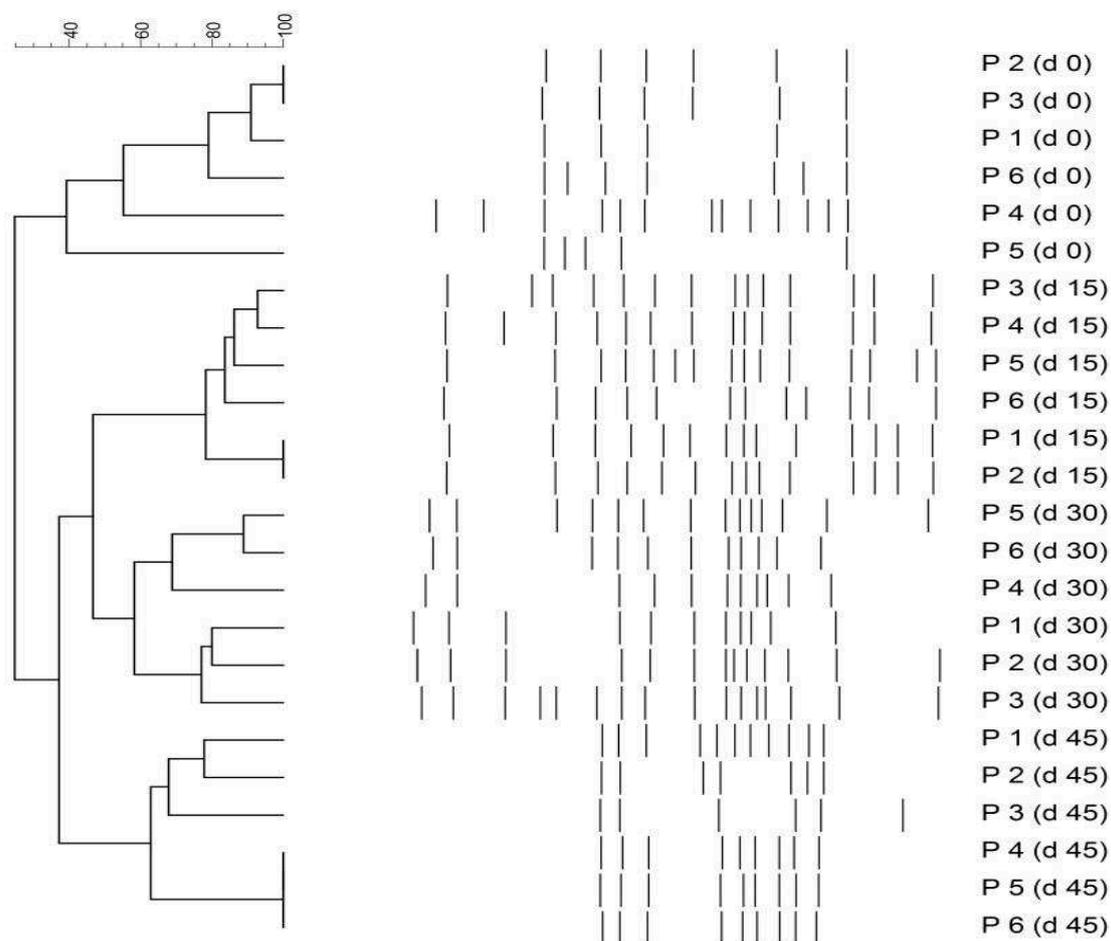


Tabla 15. Porcentaje (%) de identidad de secuencias parciales de 16S ADNr con secuencias presentes en la base de datos del NCBI.

Banda	Género o especie relacionado	Identidad (%)	NCBI Número de acceso
1 día			
a	<i>Enterococcus</i> sp.	98	JQ739629.1
b	Bacterias no cultivables, <i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> sp.	99	KF109509.1/KT005237.1/ KR148992.1
c	<i>Enterococcus faecium</i>	99	KR265159.1
d	Bacterias no cultivables, <i>Escherichia coli</i>	99	KF109509.1/ KT005237.1
e	<i>Lactobacillus</i> sp. no cultivable	95	GQ179737.1
f	Bacterias no cultivables, <i>Clostridium</i> sp.	96	JX223097.1

g	<i>Enterococcus</i> sp.	98	KJ394444.1
h	Bacterias no cultivables, <i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> sp.	99	KJ421448.1/CP010344.1/ KM051098.1
15 días			
a	Bacterias no cultivables, <i>Clostridium</i> sp., <i>Hespellia</i> sp.	91	EU771998.1/ KJ722502.1/ KC854374.1
b	Bacterias no cultivables, <i>Robinsoniella</i> sp. no cultivable, <i>Robinsoniella peoriensis</i>	99	KT599233.1/KP102830.1/JX424580.1
c	Bacterias no cultivables, <i>Clostridium</i> sp. no cultivable	97	HG810865.1/ KP106011.1
d	Bacterias no cultivables	83	EU771779.1
e	Bacterias no cultivables, <i>Clostridium</i> sp. no cultivable, <i>Blautia</i> sp. no cultivable	98	AY990703.1/ KP108904.1/KP102198.1
f	Bacterias no cultivables, <i>Vallitalea</i> sp. no cultivable, <i>Clostridium</i> sp.	97	JX223097.1/ KF758641.1/KJ722502.1
g	<i>Lachnospiraceae</i> no cultivable, <i>Clostridium</i> sp. no cultivable, <i>Anaerostipes</i> sp. no cultivable, <i>Ruminococcus</i> sp. no cultivable	99	KP108786.1/ KP108904.1/KP109148.1/ KP106621.1
h	Bacterias no cultivables, <i>Clostridium</i> sp.	97	KP780129.1/ KJ722502.1
i	Bacterias no cultivables, <i>Clostridium</i> sp. no cultivable	97	KM367755.1/ KP108904.1
30 días			
a	Bacterias no cultivables	91	HG810869.1
b	Bacterias no cultivables	99	KM367501.1
c	<i>Lachnospiraceae</i> no cultivable, <i>Clostridium</i> sp. no cultivable	97	KP102507./ AY675969.1
d	Bacterias no cultivables	100	HG967644.1
e	Bacterias no cultivables, <i>Clostridium</i> sp.	84	KC806031.1/ HG326494.1
f	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. crispatus</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. gallinarum</i>	100	KR232863.1/KC561106.1/DQ317562.1/ KP987308.1/KT368991.1/LC071810.1
g	<i>Streptococcus</i> sp. no cultivable, <i>Streptococcus</i> sp.	97	KP104503.1/ KR232855.1
h	Bacterias no cultivables	95	KT775118.1
45 días			

a	<i>Lactobacillus</i> sp. no cultivable	100	HQ794794.1
b	Bacterias no cultivables, <i>Alistipes</i> sp. no cultivable	98	GU104253.1/ KP105298.1
c	Bacterias no cultivables, <i>Robinsoniella</i> sp. no cultivable	100	HG967643.1/KP102830.1
d	<i>Lachnospiraceae</i> no cultivable	89	KP104134.1
e	Bacterias no cultivables	96	GQ178922.1
f	<i>Lachnospiraceae</i> no cultivable, <i>Clostridium</i> sp.	98	KR086556.1/KJ722502.1
g	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. amylovorus</i>	100	KP987308.1/KT368991.1/LC071810.1/ KT185019.1
h	<i>Lactobacillus salivarius</i>	100	KP979479.1
i	<i>Escherichia</i> sp. no cultivable	99	DQ856964.1

La comparación de fragmentos de ADN con secuencias de GenBank evidenció la presencia en el día 1 de cepas pertenecientes a los géneros *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Shigella* y *Escherichia* (Tabla 15). El orden *Clostridiales* fue el más frecuente en el ciego de pollos parrilleros de 15 d de vida, con una alta proporción de miembros del género *Clostridium*. Además, algunos fragmentos alinearon con especies de los géneros *Alistipes*, *Anaerostipes*, *Blautia*, *Hespellia*, *Ruminococcus* y *Robinsoniella* (Tabla 15). En el día 30, la microbiota del ciego fue más diversa y estaba dominada principalmente por *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y bacterias no cultivables (Tabla 15). El perfil de la microbiota del ciego de pollos parrilleros al día 45 constaba de *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Escherichia* y bacterias no cultivables. Comparativamente, en el día 45 se observó una mayor población de *Lactobacillus*.

Fue posible encontrar bandas en la misma posición que la cepa de referencia *L. salivarius* DSPV 001P en muestras de pollos parrilleros de todas las edades. Sin embargo la secuenciación de dichas bandas coincidió con *L. salivarius* sólo en muestras de pollos parrilleros de 45 d de edad (Tabla 15).

4.8 Influencia de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P liofilizada sobre la microbiota intestinal, la translocación bacteriana, la ganancia de peso y el índice de conversión de pollos parrilleros

Los recuentos efectuados evidenciaron ausencia de crecimiento bacteriano en el hígado de los pollos tratados. Por otra parte, la cepa probiótica se recuperó desde buche y ciego a lo largo de todos los muestreos (Tabla 16 y 17). En el grupo control se observó ausencia de crecimiento de microbiota láctica en hígado y TGI. En buche, no se encontraron diferencias significativas en el recuento de bacterias lácticas totales ($P=0,162$), levaduras ($P=0,872$), enterobacterias ($P=0,350$) y *E. coli* ($P=0,827$) entre los grupos tratados y control (Tabla 16). En ciego, no hubo diferencias significativas en el recuento de bacterias lácticas ($P=0,377$), enterobacterias ($P=0,748$) y *E. coli* ($P=0,089$) entre los grupos tratados y control. Se hallaron diferencias significativas en el número de levaduras en ciego ($P=0,037$) a favor del grupo control (Tabla 17). No hubo aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes a partir de las muestras de ciego e hisopados cloacales en ninguno de los grupos.

Tabla 16. Microbiota del buche de pollos parrilleros suplementados con *L. salivarius* DSPV 001P (G-P) y no suplementados (G-C) durante 6 semanas de experimentación.

Tratamiento	Día	BAL (Log UFC/g)	<i>L. salivarius</i> DSPV 001P (Log UFC/g)	Enterobacterias (Log UFC/g)	<i>E. coli</i> (Log UFC/g)	Levaduras (Log UFC/g)
G-P	0	5,41	0,00	4,89	2,82	0,00
	7	7,64	5,60	4,23	3,63	2,05
	14	8,45	4,56	6,02	5,25	0,62
	21	8,13	1,95	3,77	3,16	3,16
	28	8,20	4,16	5,41	4,82	1,65
	35	7,86	4,59	6,23	5,15	1,77
	42	8,28	4,20	5,74	4,63	1,32
G-C	0	6,02	0,00	5,11	3,91	0,67
	7	7,63	0,00	4,85	3,74	0,60

	14	8,02	0,00	5,46	3,65	0,00
	21	8,02	0,00	6,19	4,80	3,14
	28	6,91	0,00	5,80	4,77	1,33
	35	7,33	0,00	5,58	4,53	1,29
	42	8,20	0,00	6,19	4,88	3,09

Tabla 17. Microbiota del ciego de pollos parrilleros suplementados con *L. salivarius* DSPV 001P (G-P) y no suplementados (G-C) durante 6 semanas de experimentación.

Tratamiento	Día	BAL (Log UFC/g)	<i>L. salivarius</i> DSPV 001P (Log UFC/g)	Enterobacterias (Log UFC/g)	<i>E. coli</i> (Log UFC/g)	Levaduras (Log UFC/g)
G-P	0	1,82	0,00	0,00	0,00	0,00
	7	8,78	4,85	7,71	6,85	3,01
	14	8,60	4,22	8,91	7,68	2,94
	21	8,13	3,24	9,19	7,57	3,85
	28	8,37	1,90	8,58	6,90	3,89
	35	8,12	3,86	8,26	7,22	2,44
	42	8,34	3,14	7,70	6,73	3,06
G-C	0	5,99	0,00	0,00	2,49	0,00
	7	8,94	0,00	7,99	6,73	2,36
	14	8,26	0,00	7,85	7,36	3,71
	21	7,80	0,00	8,53	7,11	4,87
	28	7,62	0,00	8,80	7,90	4,65
	35	8,07	0,00	9,33	8,16	3,77
	42	8,77	0,00	7,52	6,64	4,19

Hubo diferencias significativas en el peso de los pollos parrilleros ($P < 0,001$) entre los grupos tratados y control, a favor del grupo probiótico. En promedio,

los pollos probióticos pesaron 2902 g al finalizar el ensayo, mientras que el peso de los pollos controles fue de 2724 g (Tabla 18).

Tabla 18. Peso de pollos parrilleros suplementados con *L. salivarius* DSPV 001P (G-P) y no suplementados (G-C) durante 6 semanas de experimentación.

Tratamiento	Día	Promedio (g)	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
				Límite inferior	Límite superior
G-P	0	35,00	,000	35,000	35,000
	7	141,46	1,807	137,894	145,029
	14	383,43	4,489	374,565	392,295
	21	836,88	8,876	819,357	854,410
	28	1373,30	14,755	1344,166	1402,438
	35	1984,98	23,110	1939,343	2030,611
	42	2904,88	42,708	2820,551	2989,217
G-C	0	35,00	,000	35,000	35,000
	7	142,65	1,885	138,932	146,377
	14	364,82	4,684	355,573	374,072
	21	793,30	9,261	775,017	811,590
	28	1316,28	15,395	1285,879	1346,678
	35	1930,81	24,112	1883,197	1978,423
	42	2723,92	44,560	2635,934	2811,914

El consumo se incrementó de $130 \pm 0,010$ g/pollo a $1665 \pm 0,062$ g/pollo en el G-P y de $123 \pm 0,004$ g/pollo a $1645 \pm 0,038$ g/pollo en el G-C entre la primera y última semana del ensayo. No hubo diferencias significativas en el consumo entre ambos grupos ($P=0,072$). En lo que respecta a eficiencia de conversión alimenticia, no hubo diferencias significativas entre los grupos ($P=0,533$). Los valores de conversión alimentaria muestran que los animales del G-P fueron capaces de aumentar 1 kg su peso corporal por cada 1,58 kg de alimento consumido, mientras que los del G-C aumentaron 1 kg por cada 1,63 kg de alimento consumido. La mortandad fue de un 10% en el G-P y un 16,67% en el

grupo control. Aunque los pollos del G-C se murieron más, no hubo diferencias estadísticamente significativa ($P=0,130$).

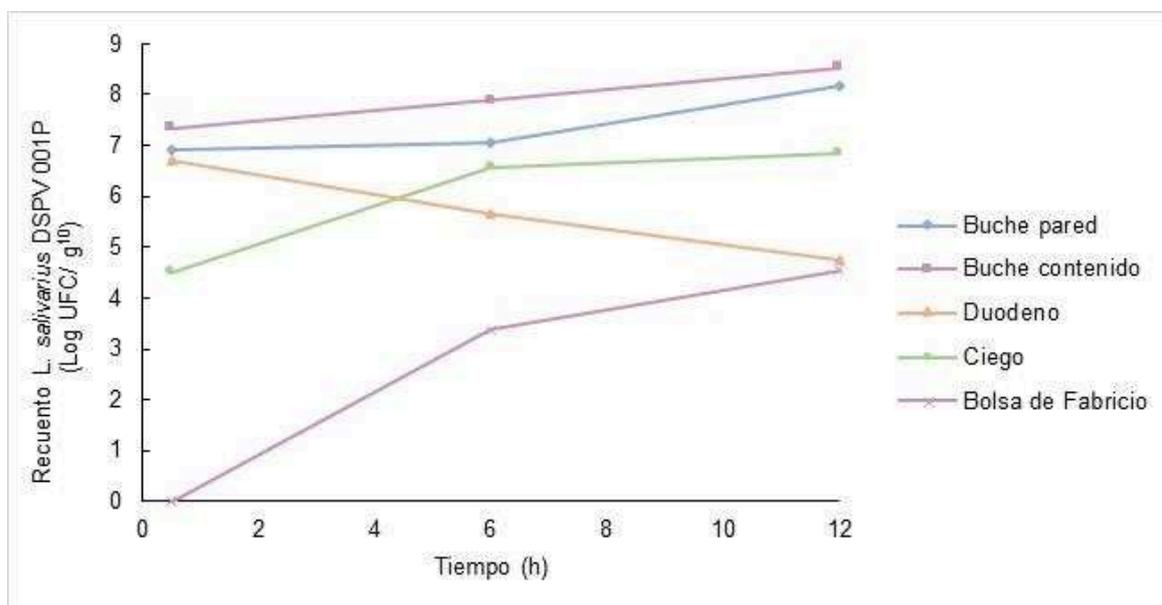
4.9 Monitoreo de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P mediante tinción con FITC

4.9.1 Pruebas microbiológicas

Los recuentos efectuados en medio MRS evidenciaron ausencia de crecimiento de la cepa en el hígado de los G-P. En el G-C se observó ausencia de crecimiento bacteriano en hígado y TGI.

Después de 30 min de la suplementación, la cepa se recuperó desde todas las porciones del TGI (Figura 17). En el buche, la tasa de recuperación promedio de *L. salivarius* DSPV 001P fue 6,82 Log UFC/0,1 g (DS 1,173) para la pared y 7,35 Log UFC/0,1 g (DS 1,07) para el contenido. El grado de recuperación de la cepa probiótica en buche fue mayor 6 h y 12 h luego de la administración de la bacteria (Figura 17). A lo largo del período de estudio, el nivel de *L. salivarius* DSPV 001P en duodeno disminuyó desde 6,70 Log UFC/0,1 g (DS 1,71) a 4,75 Log UFC/0,1 g (DS 2,40) (Figura 17). No hubo recuentos en los ciegos de pollos parrilleros que habían recibido 9,5 Log UFC, 8,5 Log UFC y 7,5 Log UFC. Sin embargo, en pollos tratados con 10 Log, la carga microbiana fue de 5,12 Log UFC/0,1 g (DS 0,94) a los 30 min. La suplementación resultó en un incremento en el nivel de *L. salivarius* DSPV 001P en ciego a 6,57 Log UFC/0,1 g (DS 1,14) y 6,86 Log UFC/0,1 g (DS 0,88) 6 y 12 h luego de la suplementación probiótica, respectivamente (Figura 17).

Figura 17. Recuperación de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P en el TGI de pollos parrilleros.



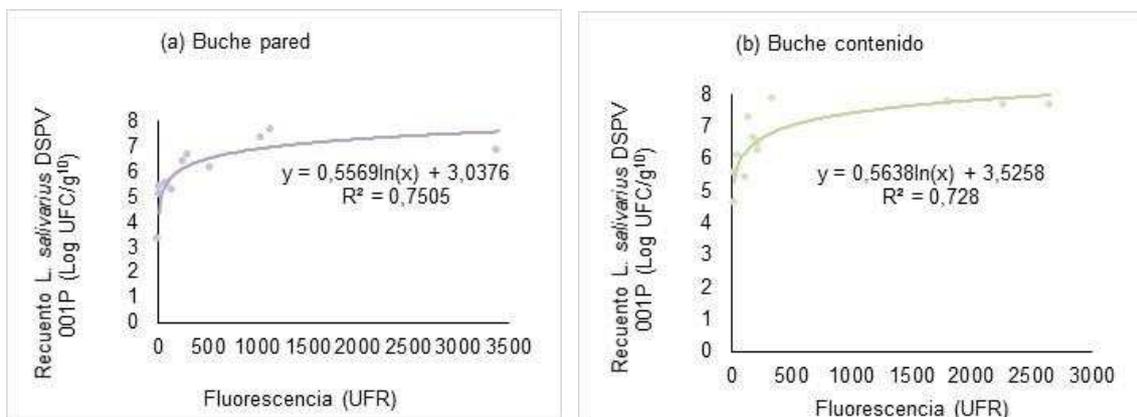
L. salivarius DSPV 001P pudo ser recuperada desde la bolsa de Fabricio 6 h post suplementación, con un valor máximo de 4,10 Log UFC/0,1g. Asimismo la cepa alcanzó un valor máximo de 5,39 Log UFC/0,1 g 12 h tras la administración. Hubo diferencias significativas en los recuentos obtenidos dependiendo de la sección del TGI, la dosis suministrada y el período de tiempo estudiado. Los recuentos fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) en la pared y el contenido de buche en comparación con duodeno y ciego. En cuanto a la dosis administrada, los recuentos fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) en los pollos que habían recibido 10 Log UFC de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P, en relación a aquellos que se les había suministrado concentraciones menores. Aunque la cepa se comportó de forma diferente en cada órgano evaluado, en general, los recuentos fueron mayores 12 h después de la administración de la bacteria ($P < 0,05$).

4.9.2 Cuantificación de fluorescencia en tejidos y contenido gastrointestinal

En buche y duodeno, la señal fluorescente fue intensa 30 min después de la administración de las bacterias marcadas, mientras que se redujo transcurridas 6 h y 12 h. La cepa demoró más tiempo en alcanzar ciego y bolsa de Fabricio:

6 h y 12 h luego de la administración oral de las bacterias fluorescentes, la señal fue detectada en estos órganos. Los modelos de regresión y coeficientes de determinación (R^2) obtenidos al comparar los recuentos microbiológicos y las UFR se presentan en la Figura 18. El R^2 fue de 0,75 y 0,73 en la mucosa del buche y el contenido de buche respectivamente, 30 min luego de la administración de *L. salivarius* DSPV 001P marcada con FITC. La curva describió correctamente la relación entre las UFR y la técnica de referencia (Figura 18a, 18b). En el duodeno, los resultados mostraron una importante correlación ($R^2 = 0,88$) entre las UFR y los recuentos microbiológicos 30 min después del suministro de la cepa (Figura 18c). En el ciego, se obtuvo un valor de $R^2 = 0,80$ y $R^2 = 0,72$ 6 h y 12 h después de la administración de las bacterias marcadas, lo que demuestra una fuerte relación entre el modelo y la variable de respuesta (Figura 18d, 18e).

Figura 18. Correlación entre recuentos microbiológicos y fluorescencia. (a) Mucosa del buche luego de 30 min de la administración de *L. salivarius* DSPV 001P marcada con FITC; (b) Contenido de buche luego de 30 min de la administración de *L. salivarius* DSPV 001P marcada con FITC; (c) Duodeno luego de 30 min de la administración de *L. salivarius* DSPV 001P marcada con FITC; (d) Ciego luego de 6 h de la administración de *L. salivarius* DSPV 001P marcada con FITC; (e) Ciego luego de 12 h de la administración de *L. salivarius* DSPV 001P marcada con FITC.



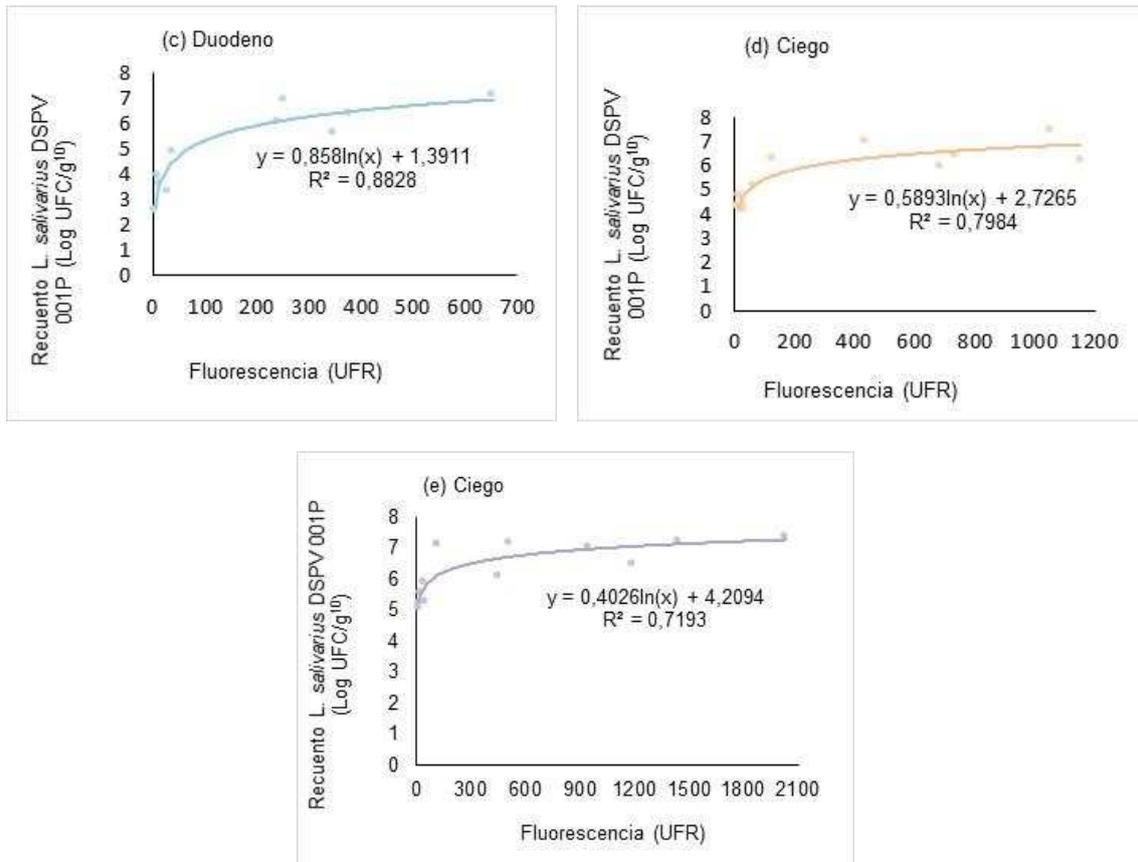
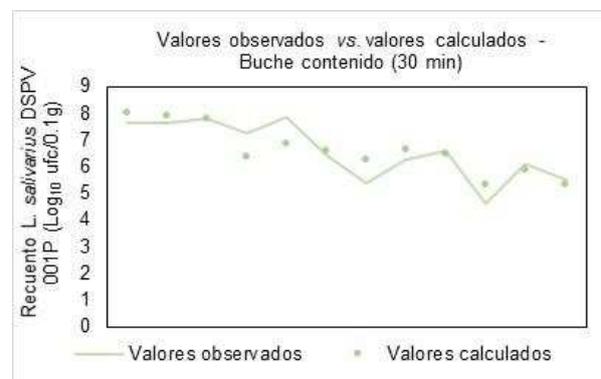
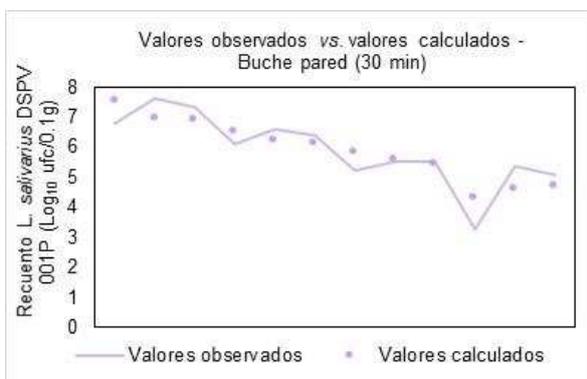
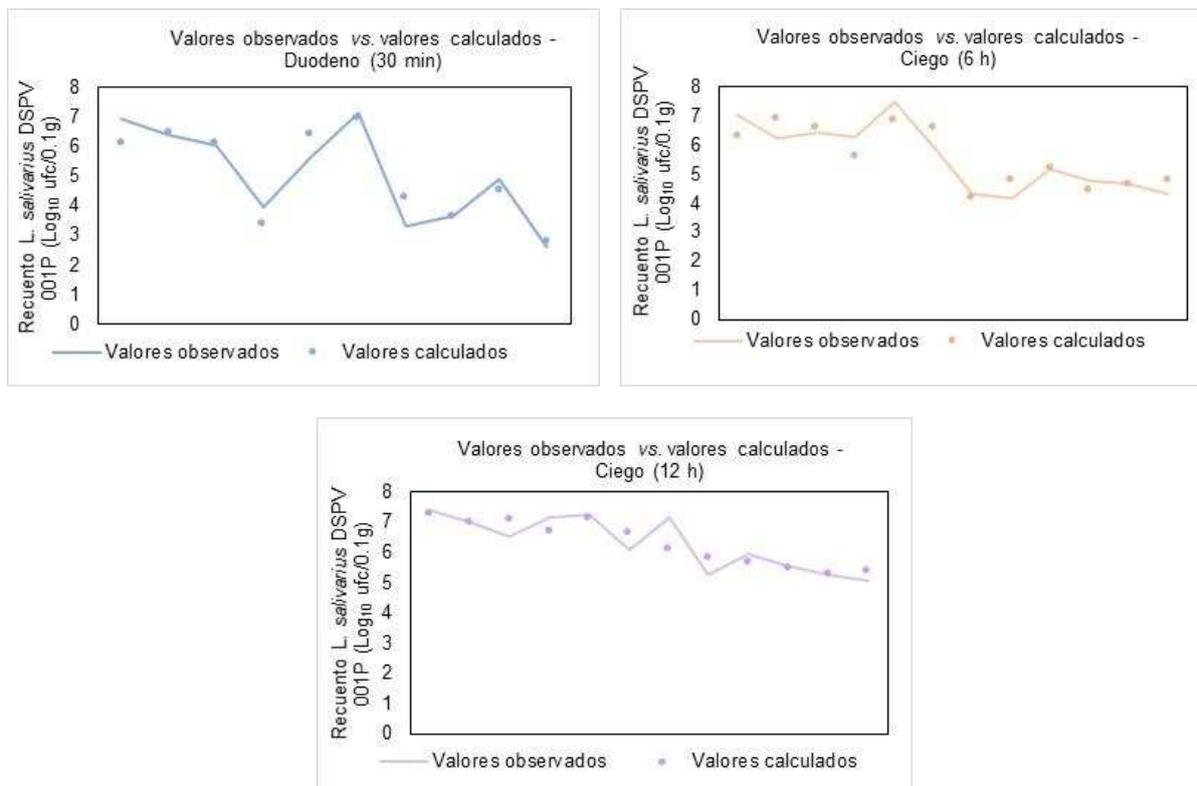


Figura 19. Recuento de *L. salivarius* DSPV 001P (Log UFC / 0,1 g) a distintos tiempos y en muestras de diferentes órganos. Los valores observados de la técnica de recuento en placa se indican con líneas continuas, mientras que los valores calculados con la ecuación obtenida por el modelo logarítmico se indican mediante círculos.





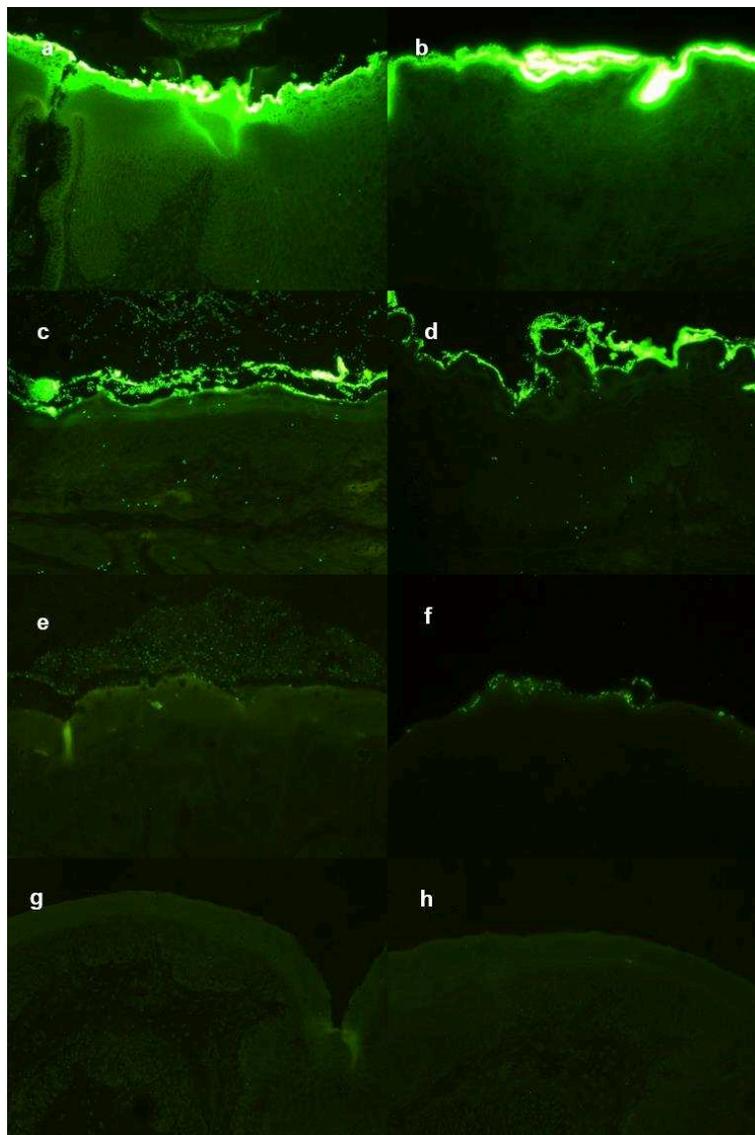
En todos los casos mencionados, el R^2 fue significativo ($P < 0,05$), y los datos calculados fueron similares a los datos observados (Figura 19). Sin embargo no hubo correlación entre los recuentos microbiológicos y las UFR en el ciego 30 min después del suministro de *L. salivarius* DSPV 001P marcada con FITC. Asimismo no se encontró correlación entre los recuentos microbiológicos y las UFR en buche y duodeno 6 h y 12 h después de la administración. En promedio, la fluorescencia obtenida en bolsa de Fabricio en pollos tratados con 10 Log UFC fue 54 UFR (6 h) y 60 UFR (12 h). No hubo fluorescencia a los 30 min independientemente de la dosis utilizada, y a las 6 h y 12 h en la bolsa de pollos parrilleros que habían recibido concentraciones menores de la cepa. No se encontró señal fluorescente por debajo de 2,5 Log UFC/0,1 g, constituyendo éste el límite de cuantificación inferior de la técnica.

4.9.3 Detección de bacterias marcadas fluorescentes en cortes histológicos

Luego de 30 min de la administración de las bacterias marcadas fluorescentes, se observaron “clusters” o agregados de células recorriendo el lumen de buche,

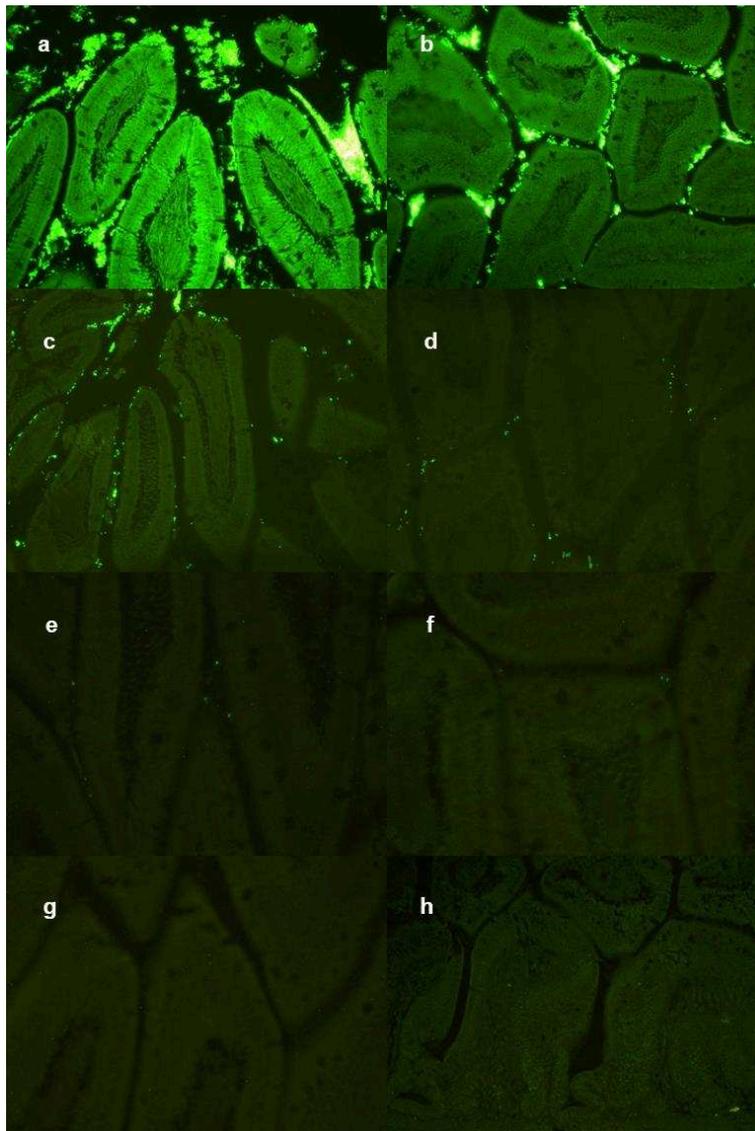
duodeno y ciego. Se distinguieron bacterias marcadas en la túnica mucosa y submucosa del buche de los pollos (Figura 20).

Figura 20. Interacción con el buche de *L. salivarius* DSPV 001P marcadas con FITC. (a, b) Fluorescencia en buche luego de 30 min de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (c, d) Fluorescencia en buche luego de 6 h de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (e, f) Fluorescencia en buche luego de 12 h de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (g, h) Bucho de pollos controles (ausencia de bacterias marcadas fluorescentes). Aumento 400X.



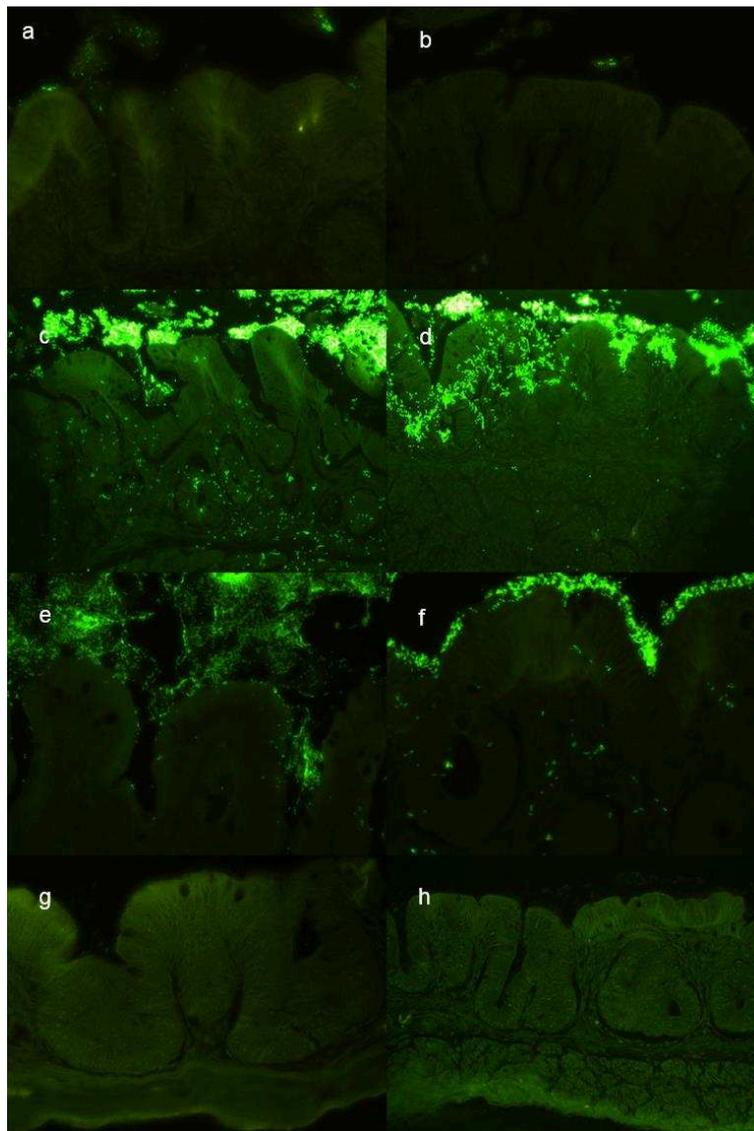
En duodeno, agregados de células fueron hallados en las vellosidades intestinales, en íntimo contacto con las células epiteliales que las recubren. Se observaron también bacterias marcadas en la lámina propia y en la muscular de la mucosa (Figura 21). Una mayor cantidad de agregados celulares pudo observarse en los pollos que recibieron 10 y 9,5 Log UFC. Agregados más pequeños y bacterias aisladas fueron visualizados en aquellos animales que recibieron 8,5 y 7,5 Log UFC.

Figura 21. Interacción con el duodeno de *L. salivarius* DSPV 001P marcadas con FITC. (a, b) Fluorescencia en duodeno luego de 30 min de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (c, d) Fluorescencia en duodeno luego de 6 h de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (e, f) Fluorescencia en duodeno luego de 12 h de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (g, h) Duodeno de pollos controles (ausencia de bacterias marcadas fluorescentes). Aumento 400X.



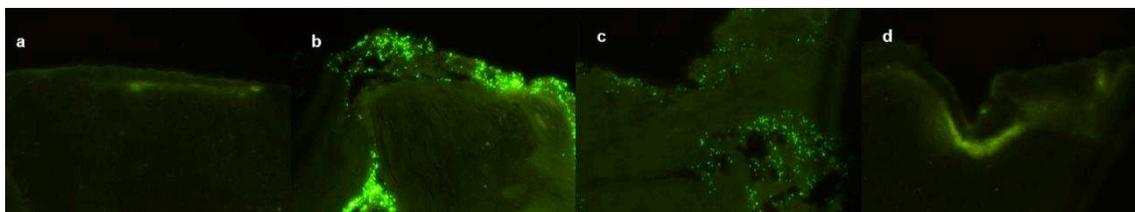
Se detectaron bacterias fluorescentes en los ciegos de los pollos que habían recibido 10 Log UFC de *L. salivarius* DSPV 001P. En tanto, sólo bacterias fluorescentes dispersas se encontraron en los ciegos de los pollos que habían recibido 9,5 Log UFC de *L. salivarius* DSPV 001P y no se observaron bacterias en los ciegos de las aves que habían consumido una concentración bacteriana inferior (Figura 22).

Figura 22. Interacción con el ciego de *L. salivarius* DSPV 001P marcadas con FITC. (a, b) Fluorescencia en ciego luego de 30 min de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (c, d) Fluorescencia en ciego luego de 6 h de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (e, f) Fluorescencia en ciego luego de 12 h de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (g, h) Ciego de pollos controles (ausencia de bacterias marcadas fluorescentes). Aumento 400X.



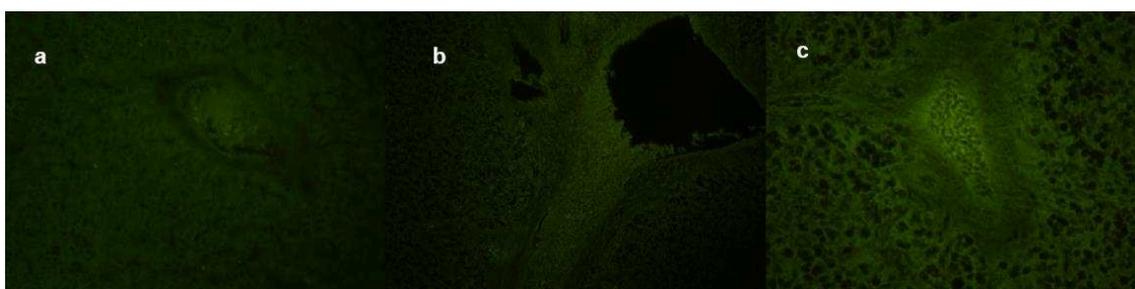
No se hallaron bacterias marcadas en la bolsa de Fabricio 30 min después de la suplementación (Figura 23).

Figura 23. Interacción con la bolsa de Fabricio de *L. salivarius* DSPV 001P marcadas con FITC. (a) Fluorescencia en bolsa de Fabricio luego de 30 min de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P (ausencia de bacterias marcadas fluorescentes); (b) Fluorescencia en bolsa de Fabricio luego de 6 h de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (c) Fluorescencia en bolsa de Fabricio luego de 12 h de la administración de 10 Log de *L. salivarius* DSPV 001P; (d) bolsa de Fabricio de pollos controles (ausencia de bacterias marcadas fluorescentes). Aumento 400X.



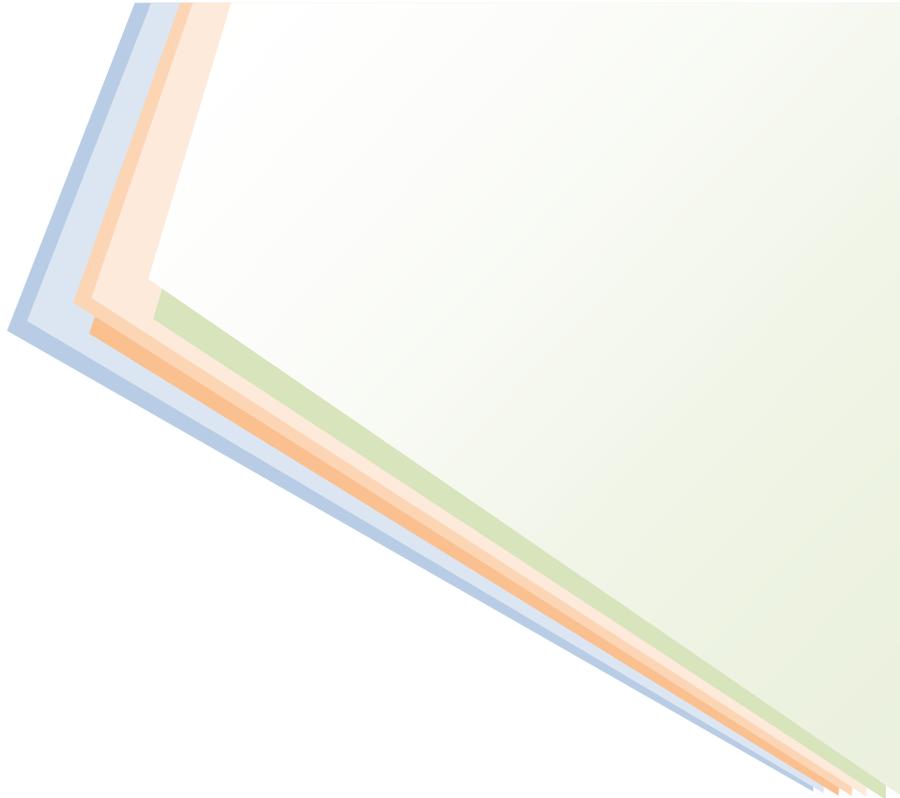
Hubo ausencia de translocación bacteriana a hígado en los G-P (Figura 24). *L. salivarius* DSPV 001P marcada con FITC no fue detectada en el G-C.

Figura 24. (a, b, c) Fluorescencia en hígado luego de la administración de *L. salivarius* DSPV 001P marcadas con FITC (ausencia de bacterias marcadas fluorescentes). Aumento 400X.

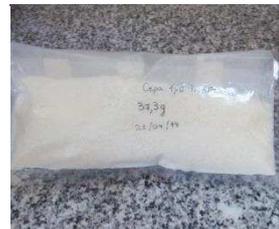


Hubo un aumento notable en el número de bacterias fluorescentes observado en mucosa, submucosa y capa muscular del ciego 6 h y 12 h después de la administración (Figura 22). Además, se observaron bacterias en la bolsa de Fabricio de los pollos parrilleros que habían recibido 10 Log UFC (Figura 23). Cantidades menores de bacterias fluorescentes se observaron en el lumen de buche. Sin embargo un mayor grado de bacterias marcadas se visualizó en

mucosa y submucosa de buche 6 h después de la suplementación (Figura 20). Por otra parte, sólo unas pocas bacterias se observaron en el duodeno transcurridas 6 h y 12 h del suministro (Figura 21). No hubo translocación bacteriana a hígado en los G-P (Figura 24). *L. salivarius* DSPV 001P marcada con FITC no fue detectada en el G-C.



5. DISCUSIÓN



5.1 Medios de crecimiento de cepas probióticas aviares y liofilización como método de conservación

La industria permanentemente muestra su interés en formular medios de cultivo económicos, que permitan el desarrollo de los cultivos probióticos hasta el nivel requerido en el proceso de elaboración. Es necesario contar con una cantidad de microorganismos suficiente que permita compensar la pérdida de viabilidad causada por el proceso tecnológico y durante la etapa de almacenamiento (Gueimonde y Sánchez, 2012). Esto tiene especial importancia, ya que el inóculo a su vez debe contar con una cantidad satisfactoria de microorganismos en el momento de ser administrado al animal para posibilitar la expresión de sus efectos probióticos. Se ha mencionado que la inoculación de 10^9 UFC/animal es suficiente para mostrar un efecto de colonización y permanencia, representado por los altos niveles del inóculo presentes en el TGI de pollos parrilleros (Chen y col., 2012). La utilización de leche o sus subproductos, en reemplazo de los medios comerciales disponibles para el crecimiento de *Lactobacillus*, disminuye considerablemente los costos de producción. En nuestros estudios, la leche y el permeado de suero de queso resultaron ser dos sustratos convenientes y económicos para el crecimiento de los microorganismos (Marhamatizadeh y col., 2012). La leche actuó como medio de desarrollo microbiano, matriz de conservación y medio protector para impedir la pérdida de viabilidad *in vivo* al momento de la administración oral del probiótico. La preparación del inóculo en medio leche y su almacenamiento en refrigeración o congelación, evita el costo añadido de la separación de los microorganismos desde el medio de cultivo (mediante centrifugación, filtración, etc.) y el agregado de medios nuevos o soluciones para almacenarlos (Soto, 2010). Sin embargo, la desventaja de los concentrados líquidos son los altos costos de transporte y almacenamiento (Mattila-Sandholm y col., 2002), razón por la cual se justifica la utilización de otros métodos de conservación (microencapsulación, liofilización, secado spray, etc.). Por tal motivo, en otro de los ensayos propuestos, la biomasa producida fue liofilizada. Uno de los problemas de este método de conservación, es la posible reducción de la concentración bacteriana tras el proceso de liofilización (Julean y col., 2014). En este sentido, en nuestro estudio la cepa probiótica no vio afectada su

viabilidad después del proceso de liofilización. A partir de estos resultados, podemos indicar que la liofilización de *L. salivarius* DSPV 001P utilizando leche en polvo al 6% como lioprotector, es un método recomendable para su conservación.

En cuanto a las diferentes condiciones de almacenamiento de los polvos liofilizados de *L. salivarius* DSPV 001P, se observó que la refrigeración resultó adecuada sólo a corto plazo, mientras que para la conservación a largo plazo fue necesario congelar el producto liofilizado. En apoyo a nuestros resultados, Gilliland y Lara (1988) han expuesto que durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración, el efecto del estrés celular afecta directamente su viabilidad. El almacenamiento de productos liofilizados en condiciones de congelación es usado comúnmente para preservar la viabilidad de BAL durante un largo período de tiempo manteniendo sus propiedades tecnológicas (actividad acidificante, propiedades organolépticas, etc.) (Carvalho y col., 2004).

5.2 Influencia de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P sobre la microbiota intestinal, la translocación bacteriana, la ganancia de peso y el índice de conversión de pollos parrilleros

L. salivarius DSPV 001P, *L. salivarius* DSPV 003P y *L. agilis* DSPV 004P, que mostraron resultados superiores a la media en los criterios probióticos observados *in vitro*, fueron seleccionados para el estudio de persistencia *in vivo*. Los estudios *in vitro* son útiles como tamiz en un primer proceso de selección para reducir el amplio número de cepas analizadas. Sin embargo, puede ser difícil predecir cómo estas características *in vitro* se traducen en la correspondiente actividad *in vivo*. Una ventaja potencial de los ensayos *in vivo* es la capacidad de realizar un seguimiento de las cepas durante todo el período de producción de los pollos. La generación de mutantes resistentes a rifampicina fue previamente utilizada con éxito en pollos parrilleros (Stephenson y col., 2010) y resultó útil para el monitoreo de las BAL en este trabajo. En nuestro ensayo, los recuentos mostraron ausencia de crecimiento de la microbiota láctica intestinal en MRS_{rif}. La inhibición del crecimiento de la microbiota láctica aviar autóctona por parte de la rifampicina confirmó la

sensibilidad del modelo para localizar a las tres cepas administradas. De esta manera, el estudio pudo efectuarse poniendo énfasis en la colonización y la translocación de las BAL. Después de la administración, las cepas fueron recuperadas desde buche y ciego durante un período de 72 h, lo que indica que se establecieron en el TGI. En general, la presencia de bacterias viables en el tracto intestinal es el resultado de diferentes factores: el número de microorganismos inoculados capaces de sobrevivir a las barreras biológicas, su capacidad de multiplicación, la saturación de los nichos de alojamiento y la evacuación debido a dificultades en la adhesión y competencia bacteriana (Frizzo y col., 2010). En este estudio, las cepas inoculadas fueron capaces de sobrevivir en un nicho ecológico complejo como es el TGI de pollos parrilleros. Esta característica es muy importante para los microorganismos con potencial probiótico (Rogelj y col., 2002).

La translocación bacteriana es un indicador recomendado para evaluar la seguridad de un probiótico (Locascio y col., 2001), ya que es el primer paso en el proceso de patogénesis de muchas cepas indígenas oportunistas (Berg, 1995). En consecuencia, la capacidad de translocación es un buen indicador de la posible infectividad de un probiótico (Zhou y col., 2000). Las cepas bacterianas utilizadas no mostraron capacidad para translocar al hígado, o, en caso de que lo hicieran, el sistema inmune del hospedador las eliminó antes de que pudieran ser detectadas. Es razonable pensar que las cepas analizadas en el presente trabajo no tienen la capacidad de sobrevivir fuera del intestino del animal, no causan o inducen infecciones sistémicas y no son invasivas, fortaleciendo la hipótesis que son seguras para ser añadidas como aditivos en la dieta de pollos parrilleros. Cuando las cepas más prometedoras fueron ensayada *in vivo*, se concluyó que *L. salivarius* DSPV 001P era la mejor para experimentos adicionales, ya que los recuentos de células totales fueron significativamente mayores en buche y ciego en comparación con las otras cepas. Esto podría implicar a su vez una probabilidad superior de permanecer en el TGI utilizando las dosis recomendadas, una inversión menor en la producción de biomasa, y un mayor potencial de la cepa para ejercer el efecto benéfico.

Cuando se estudió la influencia de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P en cultivo fresco sobre la microbiota intestinal y los parámetros productivos, la evolución en los pesos de los pollos durante el período de estudio fue continua y sostenida, y no mostró diferencias entre los grupos. Esto pudo deberse a inconvenientes en la distribución del probiótico. Dado que los microorganismos eran administrados a los pollos en bebederos que permitían el acceso de pocos animales por vez, y que una vez vaciado el bebedero, era llenado nuevamente con agua, es probable que solo algunos pollos tomaran la dosis de probiótico diariamente estipulada. En este caso, la diferencia entre las variables que conforman la performance de ambos grupos no pudo ser demostrada, posiblemente debido a la ingesta de una dosis insuficiente de inóculo. Por lo tanto deben realizarse nuevas investigaciones que estudien la influencia de la cepa en cultivo fresco y garanticen una distribución homogénea del probiótico.

Posteriormente, *L. salivarius* DSPV 001P liofilizada se administró a pollos parrilleros para evaluar su persistencia *in vivo*. Los recuentos indicaron que las colonias resistentes a la rifampicina comprendían una gran proporción de las BAL en el TGI de los pollos parrilleros. Está documentado que los probióticos permanecen detectables sólo temporalmente en el TGI de los animales y que la administración diaria de las cepas es necesaria para el mantenimiento de altos niveles del inóculo (Murphy y col., 1999). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que *L. salivarius* DSPV 001P es capaz de colonizar y persistir en el TGI de los pollos 28 días luego del cese de la administración. Fonty y col. (1993) sugirieron que el establecimiento de una cepa se rige, no sólo por el modo de administración, sino también por la interacción con microorganismos del entorno intestinal. Asimismo, al igual que la coprofagia ha sido implicada en la propagación de *C. jejuni* en pollos parrilleros (Line, 2006), es posible que en nuestro estudio la cepa administrada efectúe un ciclo fecal-oral como consecuencia de la alta densidad poblacional y el hábito de coprofagia de los pollos. En nuestro estudio, se determinó la capacidad de los cultivos frescos y liofilizados de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P para colonizar el TGI de pollos parrilleros. La persistencia de un probiótico luego del cese de la administración es la situación ideal para los productores, ya que las cepas no tienen

necesariamente que ser administradas de forma continua como aditivos alimentarios (Stephenson y col., 2010).

Cuando se estudió la influencia de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P liofilizada sobre la microbiota intestinal y la performance de pollos parrilleros, se encontraron diferencias significativas en el peso de los animales, a favor del grupo probiótico. Si bien no hubo diferencias significativas en el consumo entre ambos grupos, podemos afirmar que hubo una tendencia del G-P a consumir más. Leone y col. (2003) asociaron la mayor productividad de pollos suplementados con probióticos a una mayor altura de las vellosidades intestinales. El incremento de la función absorbente puede atribuirse al aumento de la superficie de absorción, de la expresión de enzimas del borde en cepillo de los enterocitos y de los sistemas de transporte de nutrientes (Awad y col., 2009). Los probióticos pueden sintetizar nutrientes, aportar coenzimas que aumentan la actividad catalítica de las enzimas endógenas o reducir compuestos perjudiciales o antinutrientes. Jin y col. (2000) demostraron que la administración de *L. acidophilus* o de un cultivo mixto de *Lactobacillus* spp. a pollos durante 40 d aumentaba significativamente los niveles de amilasa. También se ha descrito que el consumo de *L. casei* por pollos causa una disminución de la actividad ureasa en el intestino delgado, mejorando la productividad (Yeo y Kim, 1997). Esta enzima está asociada con la conversión de ácido úrico (producto de excreción de nitrógeno en aves) en amoníaco, que es un compuesto tóxico para los enterocitos.

Aunque no fue posible identificar una asociación estadísticamente significativa, la mortandad de los animales fue superior en el G-C. Es evidente que el G-P pudo mantener una microbiota intestinal indígena en equilibrio, y los animales se encontraron mejor preparados para responder exitosamente ante el eventual ingreso, colonización e invasión de patógenos.

El inóculo no mostró efectos significativos, positivos o negativos, sobre las poblaciones en estudio. No obstante, puede que las diferencias se encuentren en microorganismos que no fueron analizados en este ensayo (Jayaraman y col., 2013). Estos resultados pueden estar relacionados con un buen estado de salud de los animales debido a condiciones sanitarias óptimas. Solo la

población de levaduras en ciego se modificó debido a la administración del probiótico. En coincidencia con nuestros estudios, Ozawa y col. (1983) observaron que la administración de BAL produjo una disminución de la población de levaduras en el G-P. Sin embargo, Soto y col. (2010), informaron un incremento en el número de levaduras luego de la suplementación. Así, nuevos ensayos que involucren la cuantificación de otras especies microbianas, deben ser llevados a cabo.

La cepa mostró su poder competitivo, desplazando y reemplazando la microbiota láctica residente en buche y ciego, sin aumentar los niveles totales de BAL. Este comportamiento es el que frecuentemente se produce cuando los pollos presentan una microbiota intestinal en equilibrio que les permite desarrollarse en forma adecuada. Sin embargo, cuando los mismos se encuentran en condiciones de estrés, ocurre un desbalance en la microbiota en donde las poblaciones de lactobacilos y bifidobacterias se ven disminuidas y los microorganismos patógenos pueden estar incrementados. Un enfoque más prometedor parece estar dirigido a la utilización de BAL en los pollos con una microbiota intestinal temporalmente perturbada, por lo que resultaría interesante realizar nuevos experimentos en donde se evalúe en detalle la performance del inóculo ante un desafío con patógenos (Ritzi y col., 2014; Sadegui y col., 2015).

En la dosis utilizada, *L. salivarius* DSPV 001P no translocó, de modo que podrían utilizarse dosis superiores en futuras experiencias si ello resultara necesario para lograr mayores efectos benéficos. Por otra parte, la utilización de algún prebiótico junto a los microorganismos podría permitir que el inóculo se establezca con mayor eficiencia a nivel intestinal, y de esta manera mejorar otros parámetros productivos de los animales (Mookiah y col., 2014).

No hubo aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes a partir de las muestras de ciego e hisopados cloacales en ninguno de los grupos. Esto puede estar relacionado con las medidas de bioseguridad implementadas para acceder a los boxes de cría de los pollos (Newell y col., 2011).

5.3 Análisis de la dinámica poblacional de la microbiota del ciego de pollos parrilleros

El uso de técnicas moleculares permite que las bacterias no cultivables sean estudiadas sin las presiones selectivas inherentes a los métodos basados en cultivos tradicionales. El desarrollo de la microbiota predominante del ciego de pollos parrilleros que habían sido suplementados con *L. salivarius* DSPV 001P fue examinado usando DGGE. En este ensayo, pollos parrilleros de la misma edad, criados en las mismas condiciones, presentaron diferentes patrones de bandas, lo que sugiere que factores específicos del hospedador son importantes en el establecimiento de la comunidad bacteriana del TGI.

Un total de 34 bandas fueron analizadas. El número de bandas en los perfiles de pollos de 1 d de vida fue menor, oscilando entre cinco y trece. Sin embargo, Van der Wielen y col. (2002) informaron que las muestras intestinales de pollos de 1 d de vida no tenían bandas en geles de DGGE excepto en el buche, donde se detectó un bajo número. Esto no implica que las bacterias no estaban presentes en el ciego, pero sí que el número de bacterias era probablemente inferior al límite de detección. Las diferencias en el medio ambiente, la edad, el nivel de higiene, la dieta, la raza, la geografía y el clima pueden ser factores que afectan la microbiota cecal (Yin y col., 2010). En nuestro país, una práctica común en la producción de pollos parrilleros es emplear cama reutilizada. Este tipo de cama alberga más nutrientes, humedad y bacterias de origen intestinal que la cama nueva (Lu y col., 2003b; Cressman y col., 2010). Por lo tanto, la reutilización de la cama podría explicar en parte el mayor número de bandas encontrado en este estudio el d 1.

De acuerdo con el consenso general, la microbiota del ciego se vuelve más compleja a medida que los pollos crecen (Danzeisen y col., 2011). En este ensayo, el número de bandas visualizadas aumentó del día 1 al día 30 y luego disminuyó, lo cual puede atribuirse a una microbiota estable en el TGI de pollos parrilleros maduros (Gong y col., 2002). Sólo unas pocas secuencias pudieron ser identificadas a nivel de especie. La mayoría pudo ser clasificada a nivel de género, familia u orden. Las bacterias identificadas fueron predominantemente especies potencialmente patógenas de *Clostridium*. Esto es importante porque

el ciego es el principal sitio de colonización de *C. perfringens*, principal agente causal de la enteritis necrótica (Stanley y col., 2012). Además, algunos fragmentos alinearon con especies de los géneros *Escherichia* / *Shigella*, de particular interés debido a la aparición de cepas patógenas de *E. coli* con la capacidad de colonizar simultáneamente el TGI de seres humanos y pollos parrilleros (Mora y col., 2010). Además, se evidenció la presencia de una alta proporción de bacterias no cultivables. Es interesante observar que nuestros resultados están de acuerdo con estudios previos. Zhou y col., (2007) reportaron que la mayoría de los clones de 13 secuencias estaban estrechamente relacionados con bacterias no cultivables. Mohd Shaufi y col. (2015) encontraron al Phylum *Firmicutes* como el más frecuente en el ciego de pollos parrilleros de diferentes edades, siendo a su vez el orden *Clostridiales* el más abundante. Choi y col. (2014) encontraron que anaerobios estrictos como *Alistipes*, *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae* eran dominantes en el ciego de pollos parrilleros. Lu y col. (2003a) reportaron que *Clostridium*, *Eubacterium* y *Ruminococcus* dominaban la comunidad bacteriana del ciego de pollos parrilleros. También identificaron secuencias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Escherichia* y *Streptococcus*. Mohd Shaufi y col. (2015) informaron que la población de *Lactobacillus* era baja en el ciego de pollos parrilleros en todas las etapas. Por lo tanto, la principal diferencia observada en este estudio es un aumento de *Lactobacillus* potencialmente benéficos en el ciego de pollos parrilleros de 45 d. Estos resultados pueden atribuirse a la modulación de la microbiota por la suplementación del probiótico. Cuando la población de bacterias benéficas como *Lactobacillus* es comparativamente más baja que las de bacterias potencialmente patógenas como *Clostridium*, es necesario intervenir para mejorar la salud intestinal. Estos hallazgos sugieren que la administración de probióticos de manera temprana puede tener un impacto directo en el desarrollo de la microbiota cecal en pollos parrilleros.

Una de las ventajas del método es la posibilidad de identificar las especies bacterianas mediante la secuenciación de los productos de DGGE. No obstante, el análisis por DGGE de los productos PCR no siempre es adecuado para la identificación de todas las especies. Los productos PCR de 16S rADN analizados por DGGE tenían una longitud de 200 pb, siendo frecuente que

especies relacionadas no presenten diferencias en esta secuencia. Esto constituyó un factor que impidió una identificación fiable de todas las especies, ya que algunas secuencias compartían igual porcentaje de identidad con diferentes bacterias. Está descrito que algunas especies relacionadas tienen secuencias V3 idénticas y no pueden ser distinguidas por DGGE (Ogier y col., 2002). Asimismo, puede ocurrir que las especies difieran en esta región pero se desnaturalicen a la misma concentración de agente desnaturalizante y por ende migren a la misma posición. Otra posibilidad es la identificación de bacterias mediante la comparación de la posición de bandas obtenidas en los geles con las bandas arrojadas por cepas de identidad conocida, que es más fácil que la secuenciación de las bandas, pero no garantiza una identificación inequívoca de las bacterias (Ercolini y col., 2001).

Casos de comigración de diferentes especies se han observado en geles de DGGE (Meroth y col., 2003; Abecia y col., 2007). Algunas especies con diferencias en sus secuencias, podrían tener comportamiento de fusión idéntico y por lo tanto migrar a la misma distancia en geles de DGGE. Esto puede provocar la subestimación de diversidad, del mismo modo que se dificulta la secuenciación del ADN recuperado de aquellas bandas en las que existe comigración. Nuestros resultados mostraron bandas en la misma posición que la cepa de referencia *L. salivarius* DSPV 001P en muestras de pollos parrilleros de todas las edades. Sin embargo, por secuenciación se confirmó la presencia de *L. salivarius* sólo en animales de 45 d de edad. Además, no fue posible determinar si la bacteria secuenciada era la cepa administrada *L. salivarius* DSPV 001P o una indígena. Por esa razón, DGGE no puede ser utilizada como única herramienta para el monitoreo de cepas probióticas, aunque podría ser eficaz corroborando la aparición de las especies microbianas presentes en un probiótico comercial liofilizado (Fasoli y col., 2003), y también si se administra un probiótico de una especie que no es autóctona.

Otra desventaja del uso de DGGE es la posibilidad de tener múltiples copias heterogéneas del gen del ADNr 16S, y por lo tanto múltiples bandas para una sola especie, de manera que al interpretarse los perfiles de DGGE, puede sobreestimarse la diversidad (Nübel y col., 1996). En concordancia con esta afirmación, en este estudio se identificaron diferentes bandas que

correspondían a una misma especie. Teniendo en cuenta esta información, un posible apoyo de otros métodos debería ser evaluado. Sería interesante para complementar los datos generados la utilización de técnicas independientes del sesgo de amplificación y de métodos que permitan la enumeración de los diferentes grupos filogenéticos del TGI de pollos parrilleros (Feng y col., 2010; Kačániová y col., 2013; Lunedo y col., 2014).

Más allá de las desventajas y limitaciones mencionadas anteriormente, DGGE es un método altamente sensible y relativamente reproducible. Permite analizar simultáneamente numerosas muestras así como evaluar las diferencias y similitudes que pudieran existir entre ellas. Es ideal para realizar estudios preliminares de diversidad microbiana, como el antecedente para un estudio posterior más detallado. La técnica permite comparar rápidamente las comunidades microbianas presentes en muestras tomadas en diferentes sitios, posibilita comparar una misma comunidad a lo largo del tiempo o en presencia de diferentes condiciones ambientales, facilita la detección e identificación de microorganismos no cultivables y permite comparar la variabilidad genética de genes diana en diferentes poblaciones. A su vez, ya que el ADN contenido en cada una de las bandas de los perfiles de DGGE puede ser recuperado para posteriormente ser manipulado y/o secuenciado, es posible combinar la técnica con otros métodos moleculares que proporcionen mayor información.

5.4 Monitoreo de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P mediante tinción con FITC

En este estudio se utilizó un nuevo método para estimar los recuentos de *L. salivarius* DSPV 001P *in vivo* en diferentes secciones del TGI de pollos parrilleros. El número de bacterias y la señal fluorescente detectada en el TGI, fueron monitoreados en diferentes momentos después de la administración oral de la cepa probiótica. Los resultados mostraron una importante correlación entre las UFR y los recuentos microbiológicos. Es importante destacar que la señal fluorescente pudo ser detectada con una única administración oral de la cepa probiótica marcada. La curva obtenida describió correctamente la relación entre las dos variables, dependiendo de la sección del TGI, la dosis suministrada y el período de tiempo estudiado. La señal fluorescente se utilizó

como un indicador de las bacterias probióticas en buche y duodeno 30 min después de la suplementación. Además, la señal fluorescente pudo ser empleada para estimar el recuento bacteriano en el ciego 6 y 12 h después de la administración de *L. salivarius* DSPV 001P. A los 30 min, la señal alcanzó un máximo en buche y luego comenzó a declinar. Sin embargo el número de bacterias viables aumentó con el tiempo. Esto significa que la cepa administrada no sólo pudo persistir sino también replicarse activamente o colonizar permanentemente el buche de pollos parrilleros. Treinta minutos después de la suplementación, se observó en el duodeno una señal fluorescente alta asociada con un elevado número de bacterias. Sin embargo la señal se debilitó y los recuentos de bacterias se redujeron después de 6 y 12 h. Debido al bajo pH presente en el estómago y al rápido flujo del contenido intestinal, los recuentos bacterianos duodenales son bajos (Rinttilä y Apajalahti, 2013), por lo que estos resultados pueden ser atribuidos, al menos en parte, a las condiciones adversas a la que están expuestos los microorganismos en ese compartimento (Rocha y col., 2014).

El número de bacterias viables en el ciego se incrementó con el tiempo, alcanzando un máximo a las 12 h. Este pico se correlacionó perfectamente con el máximo nivel de señal fluorescente. Estos resultados se vinculan con el vaciado infrecuente y el tiempo de retención usualmente largo en este órgano. Hinton y col. (2000) y Warris y col. (2004) informaron que el contenido cecal no se reducía significativamente después de 24 h de privación de alimentos. Asimismo, Svihus y col. (2014) observaron material que era transportado al ciego a través de movimientos antiperistálticos continuos del colon.

Mediante microscopía de fluorescencia se estudió la interacción de las cepas en estudio con el TGI, empleando células viables marcadas con FITC. Del mismo modo que lo expresaran Vinderola y col. (2004), los cortes histológicos permitieron determinar que la cepa utilizada era capaz de interactuar en diferentes grados con las células de la mucosa gastrointestinal, y en algunos casos, establecer contacto con las células de la submucosa y la capa muscular. Esto podría ser útil para comprender el comportamiento de los microorganismos y su influencia en el hospedador, teniendo en cuenta que

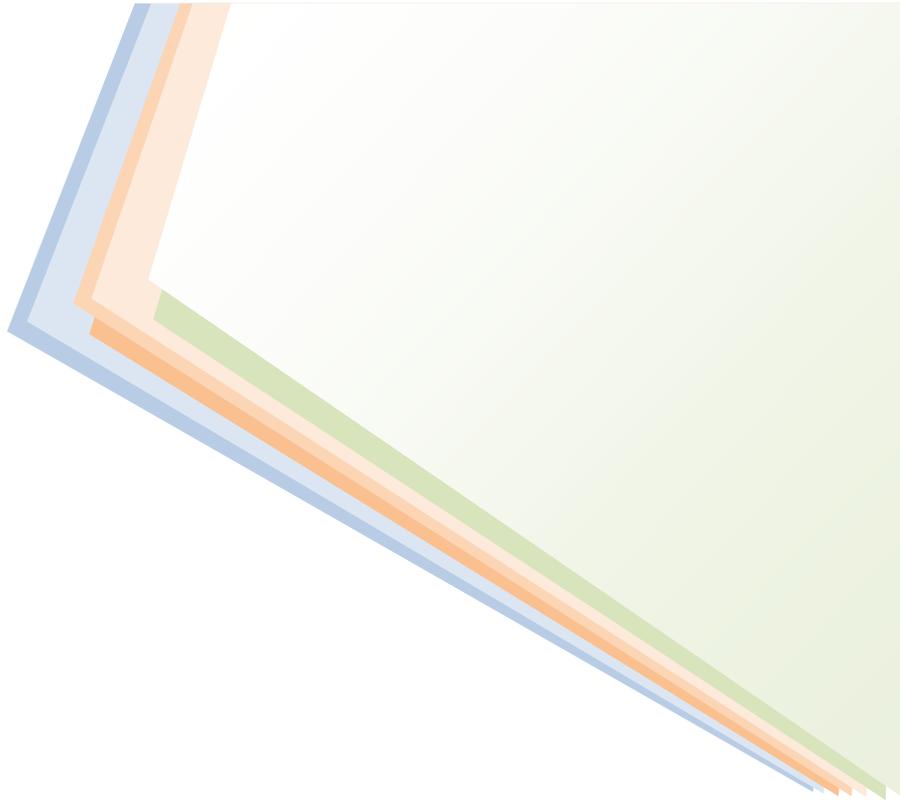
poco se sabe sobre el destino de los lactobacilos cuando se administran en un ambiente microbiano complejo *in vivo* (Hashemzadeh y col., 2015).

Los recuentos microbianos indicaron que la cepa no era capaz de translocar a hígado o, en caso de hacerlo, el sistema inmune del hospedador podía eliminar las bacterias antes de que fueran detectadas. Además, el fenómeno de translocación a hígado tampoco se observó en los cortes histológicos después de la administración de la cepa marcada en los diferentes períodos de tiempo ensayados, fortaleciendo así la hipótesis de la seguridad de la cepa en estudio para la dosis administrada si se añade como aditivo alimentario en la dieta de pollos parrilleros. Sin embargo, teniendo en cuenta que el límite de cuantificación inferior de la técnica de fluorescencia fue de 2,5 Log UFC / 0,1 g, la ausencia de la translocación no puede ser confirmada por este método.

El destino de la cepa probiótica marcada pudo ser monitoreado a través del TGI de pollos parrilleros. Sin embargo el corto tiempo a través del cual el nuevo método de cuantificación es eficaz representa una limitación que puede ser mejorada. FITC tiene una vida media corta en los sistemas vivos (Kasugai y col., 2000) y la señal fluorescente se pierde rápidamente con el crecimiento bacteriano. Esto explica lo observado en buche y duodeno 12 h después de la administración de la cepa. El rastreo de *L. salivarius* DSPV 001P marcada por un período prolongado, sería interesante para complementar los datos generados. Teniendo en cuenta nuestra información, debería evaluarse el empleo de fluoróforos más estables que puedan ser transmitidos a las bacterias replicadas en el TGI. En este sentido, sería útil probar este método de cuantificación durante más tiempo utilizando cepas probióticas que expresen la GFP (Schultz y col., 2005; Hashemzadeh y col, 2015). Además, el uso de diferentes fluoróforos en cada cepa probiótica permitiría el monitoreo *in vivo* de un inóculo multicepa.

A pesar de las desventajas y limitaciones enumeradas con anterioridad, la técnica de fluorescencia permitió la obtención de resultados en tan sólo 30 min desde el momento de la suplementación, en contraste con la tediosa preparación de medios y las 72 h de incubación requeridas para el método de recuento en placa estándar (Davis, 2014). Además, la técnica de fluorescencia

posibilitó el análisis de un número elevado de muestras en un corto período de tiempo. Esto es especialmente útil cuando el número de muestras a analizar es grande y los recursos humanos de laboratorio son limitados (Rosmini y col., 2004b).



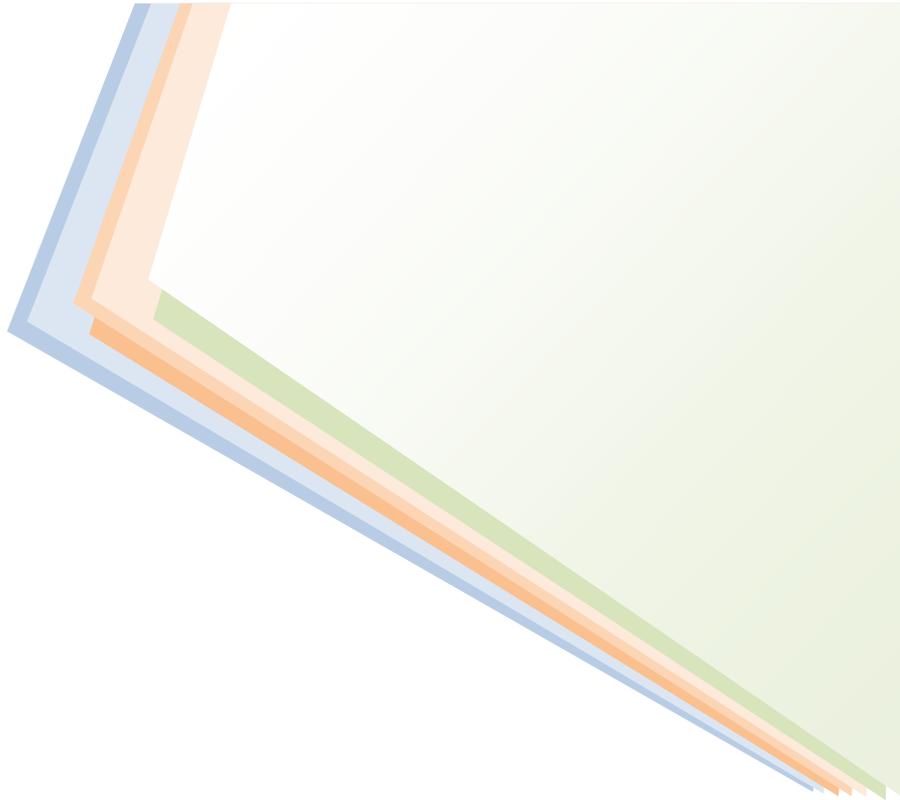
6. CONCLUSIONES



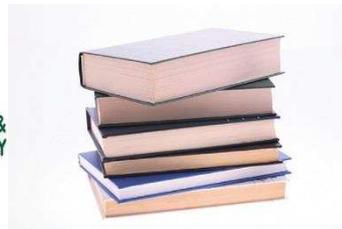
- Las BAL de origen aviar *L. salivarius* DSPV 001P, *L. salivarius* DSPV 003P y *L. agilis* DSPV 004P fueron capaces de superar las barreras biológicas, alojarse y permanecer en el TGI de pollos parrilleros.
- La leche y el permeado de suero de queso fueron medios de cultivo de bajo costo que pueden ser adaptados para el desarrollo de los microorganismos en estudio.
- La administración de las cepas no produjo efectos adversos sobre el estado de salud general de los animales. La supervivencia normal de los individuos, junto a la ausencia de translocación a los órganos del medio interno, sugieren que las cepas utilizadas no son patogénicas y probablemente sean seguras para ser aplicadas como aditivo alimentario en la dieta de pollos parrilleros.
- Los estudios desarrollados permitieron determinar que *L. salivarius* DSPV 001P era la cepa con más capacidad de llegar al sitio de acción para ejercer su efecto probiótico.
- La utilización de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P en cultivo fresco, en las condiciones que se realizó el ensayo, no tuvo influencia sobre la performance de crecimiento y la microbiota intestinal, probablemente debido a inconvenientes en la distribución del probiótico.
- La metodología de conservación por liofilización resultó adecuada para administrar la cepa en condiciones de campo. *L. salivarius* DSPV 001P liofilizada mantuvo valores superiores al NMR durante 11 semanas en condiciones de refrigeración y superiores a 8 Log hasta 365 d en condiciones de congelación.
- *L. salivarius* DSPV 001P liofilizada fue capaz de permanecer en el TGI de los pollos 28 d luego del cese de la administración, siendo esta característica de especial importancia para los productores, ya que las cepas no tendrían necesariamente que ser administradas de forma continua como aditivos alimentarios.
- La utilización de la cepa *L. salivarius* DSPV 001P liofilizada, en las condiciones que se realizó el ensayo, ejerció un efecto benéfico sobre la performance de crecimiento. En este contexto, *L. salivarius* DSPV 001P modificó, de alguna manera, los patrones del flujo de nutrientes en el

intestino, lo cual tuvo efectos benéficos sobre la utilización del alimento por parte de los animales. La administración del probiótico incrementó el consumo de alimento balanceado, mejoró significativamente la ganancia de peso de pollos parrilleros y contribuyó positivamente sobre el estado sanitario al disminuir la tasa de mortalidad.

- La generación de mutantes resistentes a rifampicina facilitó el aislamiento y la enumeración de *L. salivarius* DSPV 001P, y permitió diferenciarla fácilmente de la microbiota indígena intestinal. Además, posibilitó verificar la ausencia de la cepa en sitios extraintestinales.
- La secuenciación de los productos de DGGE permitió analizar la dinámica poblacional de la microbiota del ciego de las aves tratadas con el probiótico y confirmar la presencia de *L. salivarius* en los pollos parrilleros de 45 d de edad.
- La técnica de PGFE fue útil para comprobar que la cepa administrada presentaba una similitud del 100 % con la cepa recuperada desde el TGI.
- La tinción con FITC fue efectiva para cuantificar el número de bacterias en buche y duodeno 30 min después de la suplementación, y en ciego 6 h y 12 h después de la administración de *L. salivarius* DSPV 001P.



7. BIBLIOGRAFÍA



Abecia, L.; Fondevila, M.; Balcells, J.; Edwards, J.E.; Newbold, C.J. y McEwan, N.R. (2007) *Effect of antibiotics on the bacterial population of the rabbit caecum*. FEMS Microbiol. Lett. 272: 144 - 153.

Ahmad, I. (2006) *Effect of probiotics on broilers performance*. Int. J. Poultry Sci. 5: 593 - 597.

Altschul S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990) *Basic local alignment search tool*. J. Mol. Biol. 215: 403 - 410.

Audisio, M.C.; Ahrendts Benítez, M.; Apella, M.C. y Eguaras M.J. (2012) *Probióticos en apicultura*. En: *Probióticos y Salud*. (Eds.: Cormenzana, A.; Nader-Macías, M.E.F. y Monteoliva Sanchez, M.). Díaz de Santos, Madrid, p. 449 - 462.

Awad, W.A.; Ghareeb, K.; Abdel-Raheem, S. y Böhm, J. (2009) *Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens*. Poultry Sci. 88: 49 - 55.

Balcázar, J.L.; De Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Vendrell, D.; Gironés, O. y Muzquiz, J.L. (2007) *Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 51: 185 - 193.

Barton, M.D. (2000) *Antibiotic use in animal feed and its impact on human health*. Nutr. Res. Rev. 13: 279 - 299.

Berg, R.D. (1995) *Bacterial translocation from the gastrointestinal tract*. Trends Microbiol. 3: 149 - 54.

BioRad (1999) The DCode™ Universal Mutation Detection System.

Bitterncourt, L.C.; Silva, C.C.; Garcia, P.D.S.R.; Zanardo, D.C.Z.; Albuquerque, R. y Araújo, L.F. (2011) *Influence of a probiotic on broiler performance*. R. Bras. Zootec. 40: 2739 - 2743.

Blajman, J.E.; Frizzo, L.S.; Zbrun, M.V.; Astesana, D.M.; Fusari, M.L.; Soto, L.P.; Rosmini, M.R. y Signorini, M.L. (2014) *Probiotics and broiler growth*

performance: a meta-analysis of randomized controlled trials. Br. Poult. Sci. 55: 483 - 494.

Blajman, J.E.; Gaziano, C.G.; Zbrun, M.V.; Soto, L.P.; Astesana, D.M.; Berisvil, A.P.; Romero Scharpen, A.; Signorini, M.L. y Frizzo, L.S. (2015) *In vitro and in vivo screening of native lactic acid bacteria towards their selection as a probiotic in broilers*. Res. Vet. Sci. 101: 50 - 56.

Burkholder, K.M.; Thompson, K.L.; Einstein, M.E.; Applegate, T.J. y Patterson, J.A. (2008) *Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to Salmonella enteritidis colonization in broilers*. Poult. Sci. 87: 1734 - 1741.

Burns, P.G. Cultivos probióticos para productos lácteos. Respuesta a nuevos Desafíos tecnológicos y estrategias para mejorar cepas. Tesis para la obtención del grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina, 2010.

Cao, L.; Yang, X.J.; Li, Z.J.; Sun, F.F.; Wu, X.H. y Yao, J.H. *Reduced lesions in chickens with Clostridium perfringens-induced necrotic enteritis by Lactobacillus fermentum 1.20291*. Poult Sci. 1: 3065 - 3071.

Carvalho, A.S.; Silva, J.; Hob, P.; Teixeiraa, P.; Malcataa, F.X. y Gibbssa, P. (2004) *Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria*. Int. Dairy J. 14: 835 - 847.

Castanon, J.I.R. (2007) *History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds*. Poult. Sci. 86: 2466 - 2471.

Chambers, J.R. y Gong, J. (2011) *The intestinal microbiota and its modulation for Salmonella control in chickens*. Food. Res. Int. 44: 3149 - 3159.

Chen, M.; Stern, N.J.; Bailey, J.S. y Cox, N.A. (1998) *Administering mucosal competitive exclusion flora for control of salmonellae*. J. Appl. Poult. Res. 7: 384 - 391.

Chen, C.Y.; Tsen, H.Y.; Lin, C.L.; Yu, B. y Chen, C.S. (2012) *Oral administration of a combination of select lactic acid bacteria strains to reduce*

the Salmonella invasion and inflammation of broiler chicks. Poult. Sci. 91: 2139 - 2147.

Chesson, A. (2005) *Phasing out antibiotic additives in the EU: Worldwide relevant for animal food production*. En: *Antimicrobial Growth Promoters: Worldwide Ban on the Horizon?* (Eds.: Barug, D.; Jong, J.; Kies, A.K.; Verstegen, M.W.A). Noordwijk aan Zee, Bastiaanse Communication, p 20-22.

Choi, J.H.; Kim, G.B. y Cha, C.J. (2014) *Spatial heterogeneity and stability of bacterial community in the gastrointestinal tracts of broiler chickens*. Poult. Sci. 93: 1942 - 1950.

Coll, P.; Coque, M.T.; Domínguez, M.A.; Vázquez, J. y Vila, J. (2005) *Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología*. En: *Procedimientos en microbiología clínica* (Eds.: Cercenado, E. y Cantón, R.).

Corrier, D.E.; Hinton, A.; Ziprin, R.L.; Beier R.C. y DeLoach, J.R. (1990) *Effect of dietary lactose on cecal pH, bacteriostatic volatile fatty acids, and Salmonella tiphymurium colonization of broiler chicks*. Avian Dis. 34: 617 - 625.

Cressman, M.D.; Yu, Z.; Nelson, M.C.; Moeller, S.J.; Lilburn, M.S. y Zerby, H.N. (2010) *Interrelations between the microbiotas in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens*. Appl. Environ. Microbiol. 76: 6572 - 6582.

Dalloul, R.A.; Lillehoj, H.S.; Tamim, N.M.; Shellem, T.A. y Doerr, J.A. (2005) *Induction of local protective immunity to Eimeria acervulina by a Lactobacillus-based probiotic*. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 28: 351 - 361.

Daneshmand, A.; Sadeghi, G.H.; Karimi, A. y Vaziry, A. (2011). *Effect of oyster mushroom (Pleurotus ostreatus) with and without probiotic on growth performance and some blood parameters of male broilers*. Anim. Feed Sci. Technol.170: 91 - 96.

Danzeisen, J.L.; Kim, H.B.; Isaacson, R.E.; Tu, Z.J. y Johnson, T.J. (2011) *Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment*. Plos One DOI: 10.1371/journal.pone.0027949.

Davis, C. (2014) *Enumeration of probiotic strains: review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria*. J. Microbiol. Meth. 103: 9 - 17.

De Man, J.D.; Rogosa, M. y Sharpe, M.E. (1960) *A médium for the cultivation of lactobacilli*. J. Appl. Bacteriol. 23: 130 - 135.

Demecková, V.; Kelly, D.; Coutts, A.G.P.; Brooks, P.H. y Campbell, A. (2002) *The effect of fermented liquid feeding on the faecal microbiology and colostrum quality of farrowing sows*. Int. J. Food Microbiol. 79: 85 - 97.

Doulgeraki, A.I.; Paramithiotis, S.; Kagkli, D.M. y Nychas, G.J. (2010) *Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions*. Food Microbiol. 27: 1028 - 1034.

Eckert, N.H.; Lee, J.T.; Hyatt, D.; Stevens, S.M.; Anderson, S.; Anderson, P.N.; Beltran, R.; Schatzmayr, G.; Mohnl, M. y Caldwell, D.J. (2010) *Influence of probiotic administration by feed or water on growth parameters of broilers reared on medicated and nonmedicated diets*. J. Appl. Poult. Res. 19: 59 - 67.

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>

Ehrmann, M.A.; Kurzak, P.; Bauer, J. y Vogel, R.F. (2002) *Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry*. J. Appl. Microbiol., 92: 966 - 975.

Ercolini, D.; Moschetti, G.; Blaiotta, G. y Coppola, S. (2001) *Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of important lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis*. Curr. Microbiol. 42: 199 - 202.

Ergun, A.; Yalcin, S. y Sacakli, P. (2000) *The usage of probiotic and zinc bacitracin in broiler rations*. Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi. 47: 271 - 280.

FAO/WHO. (2002) Joint FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. 1 - 11.

Fasoli, S.; Marzotto, M.; Rizzotti, L.; Rossi, F.; Dellaglio, F. y Torriani, S. (2003) *Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis*. Int. J. Food Microbiol. 82: 59 - 70.

FASS (Federation of Animal Science Societies). (1998) *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*. First rev. ed. Savoy IL: Federation of Animal Science Societies.

Feng, Y.; Gong, J.; Yu, H.; Jin, Y.; Zhu, J. y Han, Y. (2010) *Identification of changes in the composition of ileal bacterial microbiota of broiler chickens infected with Clostridium perfringens*. Vet. Microbiol. 140: 116 - 121.

Fernández Suárez, M.R. y Le Borgne, S. (2014) DGGE: Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante. En: Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos (Eds.: Cornejo Romero, A.; Serrato Díaz, A.; Rendón Aguilar, B.; Rocha Munive, M.G.) México, p. 149-174.

Fonty, G; Raibaud, P. y Gouet, P. (1993) Manipulation of the gut microflora: experimental approach in animals. Proc. Nutr. Soc. 52: 345 - 356.

Fox, S. (1994) *Probióticos en la nutrición animal*. Mundo Porcino. 17: 28 - 32.

Frizzo L.S.; Bertozzi, E.; Soto, L.P.; Sequeira, G.; Rodríguez Armesto, R. y Rosmini M.R. (2010) *Studies on translocation, acute oral toxicity and intestinal colonization of potentially probiotic lactic acid bacteria administered during calf rearing*. Livest. Sci. 128: 28 - 35.

Frizzo, L.S.; Zbrun, M.V.; Soto, L.P. y Signorini, M.L. (2011) *Effects of probiotics on growth performance in young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials*. Anim. Feed Sci. Tech. 169: 147 - 156.

Fuller, R. (1989) *Probiotics in man and animal*. J. Appl. Bacteriol. 66: 365 - 378.

Fuller, R. (1992) *History and development of probiotics*. En: *Probiotics: The Scientific Basis*. (Eds.: Fuller, R.). Londres, Chapman & Hall, p. 1 - 8.

Gabriel, I.; Lessire, M.; Mallet, S. y Guillot, J.F. (2006) *Microflora of the digestive tract: Critical factors and consequences for poultry*. World Poult. Sci. J. 62: 499 - 511.

Gaziano, C.G. Aislamiento y selección de bacterias ácido lácticas indígenas para mejorar la performance de crecimiento y el estado sanitario durante la crianza intensiva de aves. Tesis de Licenciado en Biotecnología. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina, 2012.

Ghadban, G. (1998) *Investigation on the efficacy of early probiotic treatment on the performance of broiler chicks*. Proceedings of 10th European Poultry Conference, June 21-26, Jerusalem, Israel. 2, 305 - 310.

Ghadban, G. (1999) *Studying on productivity of chickens broilers treated by biological products*. Ph.D. thesis, Thracian University, Stara Zagora, Bulgaria.

Ghadban, G.S. (2002) *Probiotics in broiler production – a review*. Arch. Geflügelk. 66: 49 - 58.

Ghareeb, K.; Awad, W.A.; Mohnl, M.; Porta, R.; Biarnés, M.; Böhm, J. y Schatzmayr, G. (2012) *Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of Campylobacter jejuni in broiler chickens*. Poult. Sci. 91: 1825 - 1832

Gilliland, S.E. y Lara, R.C. (1988) *Influence of storage at freezing and subsequent refrigeration temperatures on 3-galactosidase activity of Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 898 - 902.

Gong, J.; Forster, R.J.; Yu, H.; Chambers, J.R.; Sabour, P.M.; Wheatcroft, R. y Chen, S. (2002) *Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen*. FEMS Microbiol. Lett. 208: 1 - 7.

Gong, J.; Yu, H.; Liu, T.; Gill, J.J.; Chambers, J.R.; Wheatcroft, R. y Savour, P.M. (2008) *Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens*. J. Appl. Microbiol. 104: 1372 - 1382.

Grimes, J.L.; Rahimi, S.; Oviedo, E.; Sheldon, B.W. y Santos, F.B.O. (2008) *Effects of a direct-fed microbial (Primalac) on turkey poult performance and susceptibility to oral Salmonella challenge*. *Poult. Sci.* 87: 1464 - 1470.

Gueimonde, M. y Sánchez, B. (2012) *Enhancing probiotic stability in industrial processes*. *Microb. Ecol. Health Dis.* doi: 10.3402/mehd.v23i0.18562

Gunal, M.; Yayli, G.; Kaya, O.; Karahan, N. y Sulak, O. (2006) *The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers*. *Int. J. Poult. Sci.* 5: 149 - 155.

Hashemzadeh, F.; Rahimi, S.; Karimi Torshizi, M.A. y Masoudi, M.M. (2015). *Usage of green fluorescent protein for tracing probiotic bacteria in alimentary tract and efficacy evaluation of different probiotic administration methods in broilers*. *J. Agr. Sci. Tech.* 17: 345 - 356.

Heo, Y.S. y Song, H.S. (2011) *Characterizing cutaneous elastic fibers by eosin fluorescence detected by fluorescence microscopy*. *Ann. Dermatol.* 23: 44 - 52.

Higgins, S.E.; Erf, G.F.; Higgins, J.P.; Henderson, S.N.; Wolfenden, A.D.; Gaona-Ramirez, G. y Hargis, B.M. (2007) *Effect of probiotic treatment in broiler chicks on intestinal macrophage numbers and phagocytosis of Salmonella enteritidis by abdominal exudate cells*. *Poultry Sci.* 86: 2315 - 2321.

Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; Calder, P.C. y Sanders, M.E. (2014) *Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic*. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11: 506 - 514

Hinton, A.; Buhr, R.J. y Ingram, K.D. (2000) *Physical, chemical, and microbiological changes in the ceca of broiler chickens subjected to incremental feed withdrawal*. *Poult. Sci.* 79: 483 - 488.

James, R.E.; McGilliard, M.L. y Hartman, D.A. (1984) *Calf mortality in Virginia dairy herd improvements herds*. *J. Dairy Sci.* 67: 908 - 918.

Jay, J.M. (1982) *Antimicrobial properties of diacetyl*. Appl. Environ. Microbiol. 44: 525 - 531.

Jayaraman, S.; Thangavel, G.; Kurian, H.; Mani, R.; Mukkalil, R. y Chirakkal, H. (2013) *Bacillus subtilis PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with Clostridium perfringens-induced necrotic enteritis*. Poult. Sci. 92: 370 - 374.

Jin, L.Z.; Ho, Y.W.; Abdullah, N. y Jalaludin, S. (2000) *Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with lactobacillus cultures*. Poult. Sci. 79: 886 - 891.

Johansen, C.H.; Bjerrum, L.; Finster, K. y Pedersen, K. (2006) *Effects of a Campylobacter jejuni infection on the development of the intestinal microflora of broiler chickens*. Poult. Sci. 85: 579 - 587

Julean, C.; Stef, L.; Drinceanu, D.; Cean, A.; Dragomirescu, M.; Vintila, T.; Gherasim, V. y Corcionivoschi, N. (2014) *Lyophilization of probiotic bacteria for inclusion in poultry feed*. J Anim. Sci. Biotechn. 47(2): 18 - 21.

Kabir, S.M.L.; Rahman, M.M.; Rahman, M.B.; Rahman, M.M. y Ahmed, S.U. (2004) *The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers*. Int. J. Poult. Sci. 3: 361 - 364.

Kačániová, M.; Peter Haščík, P.; Arpášová, H.; Pavelková, A.; Petrová, J.; Hleba, L.; Pochop, J. y Rovná, K. (2013) *Lactobacillus genus identification isolated from gastrointestinal tract of chickens after bee products application using FISH and RTQ PCR methods*. Anim. Sci. Biotech. 46: 127 - 132.

Kailasapathy, K. y Chin, J. (2000) *Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp.* Immunol. Cell. Biol. 78: 80 - 88.

Karimi Torshizi, M.A.; Moghaddam, A.R.; Rahimi, Sh.; Mojgani, N. (2010) *Assessing the effect of administering probiotics in water or as a feed supplement on broiler performance and immune response*. Br. Poult. Sci. 51: 178 - 184.

Kasugai, S.; Fujisawa, R.; Yoshihiro, W.; Miyamoto, K. y Ohya, K. (2000) *Selective drug delivery system to bone: small peptide (Asp)₆ conjugation*. J. bone. Miner. res. 15: 936 - 943.

Klaenhammer, T. R. (1988) *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Biochemie. 70: 337 - 349.

Kumprechtova, D.; Zobac, P. y Kumprecht, I. (2000) *The effect of Saccharomyces cerevisiae Sc47 on chicken broiler performance and nitrogen output*. Czech J. Anim. Sci. 45: 169 - 177.

Kurzak, P.; Ehrmann, M.A. y Vogel, R. (1998) *Diversity of lactic acid bacteria associated with ducks*. Syst. Appl. Microbiol. 21: 588 - 592.

Lara-Flores, M.; Olivera-Castillo, L. y Olvera Novoa, M.A. (2010) *Effect of the inclusion of a bacterial mix (Streptococcus faecium and Lactobacillus acidophilus), and the yeast (Saccharomyces cerevisiae) on growth, feed utilization and intestinal enzymatic activity of Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*. IJFAS. 2: 93 - 101.

Lauzon, H.L.; Pérez-Sánchez, T.; Merrifield, D.L.; Ringø, E. y Balcázar, J.L. (2014) *Probiotic applications in coldwater fish species. Probiotics, Prebiotics and Gut Health in Aquaculture Nutrition*. Merrifield D, Ringø E (eds.), in press. Wiley-Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Lee, D.J.; Drongowski, R.A.; Coran, A.G. y Harmon, C.M. (2000) *Evaluation of probiotic treatment in a neonatal animal model*. Pediatr. Surg. Int. 16: 237 - 242.

Lee, K.W.; Li, G.; Lillehoj, H.S.; Lee, S.H.; Jang, S.I.; Babu, U.S.; Lillehoj, E.P.; Neumann, A.P. y Siragusa, G.R. (2011) *Bacillus subtilis-based direct-fed microbials augment macrophage function in broiler chickens*. Res. Vet. Sci. 91: 87 - 91.

Leone, E.; Alves de Souza, P.; Alves de Souza, H.; Oba, A.; Norkus, E.; Kodawara, L. y Azevedo de Lima, T. (2003) *Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos*. Disponible en: http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf9_2003/547_125_134.pdf

Li, Y.; Canchaya, C.; Fang, F.; Raftis, E.; Ryan, K.A.; van Pijkeren, J.P.; van Sinderen, D. y O'Toole, P.W. (2007) *Distribution of megaplasmids in Lactobacillus salivarius and other lactobacilli*. J. Bacteriol. 189: 6128 - 6139.

Line, J.E. (2006) *Influence of relative humidity on transmission of Campylobacter jejuni in broiler chickens*. Poult. Sci. 85: 1145 - 1150.

Line, J.E.; Svetoch, E.A.; Eruslanov, B.V.; Perelygin, V.V.; Mitsevich, E.V.; Mitsevich, I.P., Levchuk, V.P.; Svetoch, O.E.; Seal, B.S.; Siragusa, G.R. y Stern, N.J. (2008) *Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria*. Antimicrob. Agents Chemother. 52: 1094 - 1100.

Locascio, M.; de Ruiz Holgado, A.P.; Perdigón, G. y Oliver, G. (2001) *Enteric bifidobacteria: isolation from human infants and challenge studies in mice*. Canadian J. Microbiol. 47: 1048 - 1052.

Londero, A. (2012) *Alimentos funcionales: Obtención de un producto probiótico para aves a partir de suero de quesería fermentado con microorganismos de kéfir*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata.

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

Lu, J.; Sanchez, S.; Hofacre, C.; Maurer, J.J.; Harmon, B.G. y Lee, M.D. (2003b) *Evaluation of broiler litter with reference to the microbial composition as assessed by using 16S rRNA and functional gene markers*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 901 - 908.

Lunedo, R.; Fernandez-Alarcon, M.F.; Carvalho, F.M.S.; Furlan, L.R. y Macari, M. (2014) *Analysis of the intestinal bacterial microbiota in maize- or sorghum-fed broiler chickens using real-time PCR*. Br. Poult. Sci. 55: 795 - 803.

Lutful Kabir, S.M. (2009) *The role of probiotics in the poultry industry*. Int. J. Mol. Sci. 10: 3531 - 3546.

Marhamatizadeh, M.H.; Ehsandoost, E.; Gholami, P.; Moshiri, H. y Nazemi, M. (2012) *Effect of permeate on growth and survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum for production of probiotic nutritive beverages*. World Appl. Sci. J. 18: 1389 - 1393.

Marshall, B.M. y Levy, S.B. (2011) *Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health*. Clin. Microbiol. Rev. 24: 718 - 733.

Mattila-Sandholm, T.; Myllärinen, P.; Crittenden, R.; Mogensen, G.; Fondén, R. y Saarela, M. (2002) *Technological challenges for future probiotic foods*. Int. Dairy J. 12: 173 - 182.

Mead, G.C. (1997) *Bacteria in the gastrointestinal tract of birds*. En: *Gastrointestinal microbiology*. (Eds. Mackie, R.I.; White, B.A.; Isaacson, R.E.). Chapman & Hall, New York, p. 216 - 240

Meroth, C.B.; Walter, J.; Hertel, C.; Brandt, M.J. y Hammes, W.P. (2003) *Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 475 - 482.

Milbradt, E.L.; Okamoto, A.S.; Rodrigues, J.C.Z.; Garcia, E.A.; Sanfelice, C.; Centenaro, L.P. y Andreatti Filho, R.L. (2014) *Use of organic acids and competitive exclusion product as an alternative to antibiotic as a growth promoter in the raising of commercial turkeys*. Poult. Sci. 93: 1855 - 1861.

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Presidencia de la Nación.
<http://www.minagri.gob.ar/site/ganaderia/aves>

Mohd Shaufi, M.A.; Sieo, C.C.; Chong, C.W.; Gan, H.M. y Ho, Y.W. (2015) *Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses*. Gut pathog. DOI: 10.1186/s13099-015-0051-7.

Molnár, A.K.; Podmaniczky, B.; Kürti, P.; Tenk, I.; Glávits, R.; Virág, G.Y. y Szabó, Z.S. (2011) *Effect of different concentrations of Bacillus subtilis on growth performance, carcass quality, gut microflora and immune response of broiler chickens*. Br. Poult. Sci. 52: 658 - 665.

Mookiah, S.; Sieo, C.C.; Ramasamy, K.; Abdullah, N. y Ho, Y.W. (2014) *Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens*. J. Sci. Food Agric. 94: 341 - 348.

Mora, A.; Herrera, A.; Mamani, R.; López, C.; Alonso, M.P.; Blanco, J.E.; Blanco, M.; Dahbi, G.; García-Garrote, F.; Pita, J.M.; Coira, A.; Bernárdez, M.I. y Blanco, J. (2010) *Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among Escherichia coli poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates*. Appl. Environ. Microbiol. 76: 6991 - 6997.

Mulder, R.W.; Havenaar, R. y Huis in't Veld, J. H. (1997) *Intervention strategies: the use of probiotics and competitive exclusion microbiotas against contamination with pathogens in pigs and poultry*. En: *Probiotics: 2. Application and practical aspects*. (Eds. Fuller, R.). Chapman & Hall, Londres, p. 187 - 207.

Murphy, L.; Dunne, C.; Kiely, B.; Shanahan, F.; O'Sullivan, G.C. y Collins, J. (1999). *In vivo assessment of potential probiotic Lactobacillus salivarius strains: evaluation of their establishment, persistence, and localization in the murine gastrointestinal tract*. Microb. Ecol. Health Dis. 11: 149 - 157.

Murry, A.C.; Hinton, A.; y Morrison, H. (2004) *Inhibition of growth of Escherichia coli, Salmonella typhimurium, and Clostridium perfringens on chicken feed media by Lactobacillus salivarius and Lactobacillus plantarum*. Int. J. Poult. Sci. 3: 603 - 607.

Neeser, J.R.; Granato, D.; Rouvet, M.; Servin, A.; Teneberg, S. y Karlsson, K.A. (2000) *Lactobacillus johnsonii La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria*. Glycobiology. 10: 1193 - 1199.

Newell, D.G.; Elvers, K.T.; Dopfer, D.; Hansson, I.; Jones, P.; James, S.; Gittins, J.; Stern, N.J.; Davies, R.; Connerton, I.; Pearson, D.; Salvat, G. y Allen, V.M. (2011) *Biosecurity-based interventions and strategies to reduce Campylobacter spp. on poultry farms*. Appl. Environ. Microbiol. 77: 8605 - 8614.

Nishiyama, K.; Seto, Y.; Yoshioka, K.; Kakuda, T.; Takai, S.; Yamamoto, Y. y Mukai, T. (2014) *Lactobacillus gasseri* SBT2055 reduces infection by and colonization of *Campylobacter jejuni*. Plos One. DOI: 10.1371/journal.pone.0108827.

Nübel, U.; Engelen, B.; Fleske, A.; Snadir, J.; Wieshuber, A.; Amann, R.; Ludwig, W. y Backhaus, H. (1996) *Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in Paenibacillus polymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis*. J. Bacteriol. 178: 5636 - 5643.

Ogier, J.; Son, O.; Gruss, A.; Tailliez, P. y Delacroix-Buchet, A. (2002). *Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3691 - 3701.

Otutumi, L.K.; Biondaro Góis, M.; de Moraes Garcia, E.R. y Loddi, M.M. (2012) *Variations on the efficacy of probiotics in poultry*. En: *Probiotic in animals*. (Eds. Rigobelo, E.). Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/probiotic-in-animals/variations-on-the-efficacy-of-probiotics-in-poultry>

Ozawa, K.; Yabu-Uchi, K.; Yamanaka, K.; Yamashita, Y; Nomura, S. y Oku, I. (1983) *Effect of Streptococcus faecalis BIO-4R on intestinal flora of weanling piglets and calves*. Int. J. Food Microbiol. 45: 1513 - 1518.

Pan, D. y Yu, Z. (2014) *Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet*. Gut Microbes. 5: 108 - 119.

Pasteris, S.E.; Vera Pingitore, E.; Ale, C.E. y Nader-Macias, M.E. (2014) *Characterization of a bacteriocin produced by Lactococcus lactis subsp. lactis crl 1584 isolated from a Lithobates catesbeianus hatchery*. World J. Microbiol. Biotechnol. 30: 1053 - 1062.

Patidar, S.K. y Prajapati, J.B. (1999) *Effect of feeding Lactobacilli on serum antibody titer and faecal microflora in chicks*. M.A.N. 17: 145 - 154.

Patterson, J.A.; Burkholder y K.M. (2003) *Application of Prebiotics and Probiotics in Poultry Production*. Poult. Sci. 82: 627 - 631.

Pivnick, H. y Nurmi, E. (1982) *The Nurmi Concept and its role in the control of Salmonella in poultry*. En: *Developments in food microbiology 1*. (Eds.: Davies, R.). Applied Science Publishers, London, p. 41 - 70.

Requena, T. y Peláez, C. (1995) *Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas*. Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 35: 19 - 44.

Rinttilä, T. y Apajalahti, J. (2013). *Intestinal microbiota and metabolites – implications for broiler chicken health and performance*. J. Appl. Poult. Res. 22: 647 - 658.

Ritzi, M.M.; Abdelrahman, W.; Mohnl, M. y Dalloul, R.A. (2014) *Effects of probiotics and application methods on performance and response of broiler chickens to an Eimeria challenge*. Poult. Sci. 93: 2772 - 2778.

Rocha, T.S.; Baptista, A.A.; Donato, T.C.; Milbradt, E.L.; Okamoto, A.S. y Andreatti Filho, R.L. (2014) *Identification and adhesion profile of Lactobacillus spp. strains isolated from poultry*. Braz. J. Microbiol. 45: 1065 - 1073.

Rodklongtan, A.; La-ongkham, O.; Nitisinprasert, S. y Chitprasert, P. (2014) *Enhancement of Lactobacillus reuteri KUB-AC5 survival in broiler gastrointestinal tract by microencapsulation with alginate–chitosan semi-interpenetrating polymer networks*. J. Appl. Microbiol. 117: 227 - 238

Rogelj, I.; Matijas, B.B.; Majhenic, A.C. y Stojkovic, S. (2002) *The survival and persistence of Lactobacillus acidophilus LF221 in different ecosystems*. Int. J. Food Microbiol. 76: 83 - 91.

Rosmini, M.R.; Sequeira, G.; Guerrero Legarreta, I.; Martí, L.; Dalla Santina, R.; Frizzo, L. y Bonazza, J.C. (2004a) *Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena*. Rev. Mex. Ing. Qca. 3: 187- 197.

Rosmini, M.R.; Signorini, M.L.; Schneider, R. y Bonazza, J.C. (2004b). *Evaluation of two alternative techniques for counting mesophilic aerobic bacteria in raw milk*. Food Control. 15: 39 - 44.

- Ross, G.R.; van Nieuwenhove, C.P. y González, S.N. (2012) *Fatty acid profile of pig meat after probiotic administration*. J. Agric. Food Chem. 60: 5974 - 5978.
- Saarela M.; Mogensen G.; Fondén R.; Mättö J. y Mattila-Sandholm T. (2000) *Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties*. J. Biotech. 84: 197 - 215.
- Sablon, E.; Contreras, B.; Vandamme, E. (2000) *Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetic and biosynthesis*. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 68: 21 - 60.
- Sadeghi, A.A.; Shawrang, P. y Shakorzadeh, S. (2015) *Immune response of Salmonella challenged broiler chickens fed diets containing Gallipro®, a Bacillus subtilis probiotic*. Probiotics Antimicrob. Proteins. 7: 24 - 30.
- Salminen, S.; Deighton, M.A.; Benno, Y. y Gorbach, S.L. (1998) *Lactic acid bacteria in health and disease*. En: *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. (Eds. Salminen, S. y Von Wright, A.) Nueva York, Marcel Dekker Inc., p. 211.
- Sánchez, J.; Esteve-García, E.; McNab, J.; Díaz, D. y Gracia, M.I. *Bioefficacy of a probiotic feed additive in broiler diets*. 16th European symposium on poultry nutrition. Strasbourg, Francia, 26 al 30 de Agosto de 2007, p. 619 - 622.
- Sattler, V.A.; Mohni, M. y Klose, V. (2014) *Development of a strain-specific real-time PCR assay for enumeration of a probiotic Lactobacillus reuteri in chicken feed and intestine*. Plos One. DOI: 10.1371/journal.pone.0090208.
- Schultz, M.; Watzla, S.; Oelschlaeger, T.A.; Ratha, H.C.; Göttla, C.; Lehnc, N.; Schölmericha, J. y Lindec, H. (2005) *Green fluorescent protein for detection of the probiotic microorganism Escherichia coli strain Nissle 1917 (EcN) in vivo*. J. Microbiol. Meth. 61: 389 - 398.
- Sergeant, M.J.; Constantinidou, C.; Cogan, T.A.; Bedford, M.R.; Penn, C.W. y Pallen, M.J. (2014) *Extensive Microbial and Functional Diversity within the Chicken Cecal Microbiome*. Plos One. DOI: 10.1371/journal.pone.0091941.

Seuna, E.; Raevuori, M. y Nurmi, E. (1978) *An epizootic of Salmonella tiphymurium var. copenhagen in broilers and the use of cultured chicken intestinal flora for its control*. Br. Poult. Sci. 19: 309 - 314.

Shahir, M.H.; Afsarian, O.; Ghasemi, S. y 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*. Int. J. Poult. Sci., 13: 70 - 75.

Signorini, M.L.; Soto, L.P.; Zbrun, M.V.; Sequeira, G.J.; Rosmini, M.R. y Frizzo, L.S. (2011) *Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria*. Res. Vet. Sci. 93: 250 - 258.

Sinol Sen, S.L.; Ingale, J.S.; Kim, K.H.; Kim, Y.W.; Chou Khong, J.D. Lohakare; Kim, E.K.; Kim, H.S.; Kwon, I.K. y Chae, B.J. (2011). *Effect of Supplementation of Bacillus subtilis LS 1-2 grown on citrus-juice waste and corn-soybean meal substrate on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology of broilers*. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 24: 1120 - 1127.

Soto, L.P. Elección de un método de conservación que asegure la viabilidad de bacterias indígenas probióticas y mejore la efectividad de administración a terneros lactantes criados a campo. Tesis para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina, 2010.

Stanley, D.; Keyburn, A.L.; Denman, S.E. y Moore, R.J. (2012) *Changes in the caecal microflora of chickens following Clostridium perfringens challenge to induce necrotic enteritis*. Vet. Microbiol. 159: 155 - 62.

Stephenson, D.P.; Moor, R.J. y Allison, G.E. (2010) *Lactobacillus strain ecology and persistence within broiler chickens fed different diets: identification of persistent strains*. Appl. Environm. Microbiol. 19: 6494 - 6503.

Stern, N.J.; Eruslanov, B.V.; Pokhilenko, V.; Kovalev, Y.N.; Volodina, L.L.; Pereygin, V.V.; Mitsevich, E.V.; Mitsevich, I.P.; Borzenkov, V.N.; Levchuk, V.P.;

Svetoch, O.E.; Stepanshin, Y.G. y Svetoch, E.A. (2008) *Bacteriocins reduce Campylobacter jejuni colonization while bacteria producing bacteriocins are ineffective*. Microb. Ecol. Health Dis. 20: 74 - 79.

Svihus, B. (2014). *Function of the digestive system*. J. Appl. Poult. Res. 23: 1 - 9.

Tagg, J.R.; Dajani, A.S. y Wannamaker, L.W. (1976) *Bacteriocins of gram-positive bacteria*. Bacteriol. Rev. 40: 722 - 756.

Telg, B.E. y Caldwell, D.J. (2009) *Efficacy testing of a defined competitive exclusion product in combination with fructooligosaccharide for protection against Salmonella typhimurium challenge in broiler chicks*. J. Appl. Poultry Res. 18: 521 - 529.

Tellez, G.; Petrone, V.M.; Escorcía, M.; Morishita, T.Y.; Cobb, C.W. y Villasenõr, 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*. J. Food Prot. 5: 287 - 291.

Tellez, G.; Latorre, J.D.; Kuttappan, V.A.; Hargis, B.M. y Hernandez-Velasco, X. (2015) *Rye affects bacterial translocation, intestinal viscosity, microbiota composition and bone mineralization in turkey poults*. Plos One. DOI: 10.1371/journal.pone.0122390.

Tenover, F.C.; Arbeit, R.D.; Goering, R.V.; Mickelsen, P.A.; Murray, B.E.; Persing, D.H. y Swaminathan, B. (1995). *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing*. J. Clin. Microbiol. 33: 2233 - 2239.

Teuber, M.; Perreten, V. y Wirsching, F. (1996) *Antibiotikumresistente Bakterien: eine neue Dimension in der Lebensmittelmikrobiologie*. Lebensmittel-Technologie. 29: 182 - 199.

Torok, V.A.; Allison, G.E.; Percy, N.J.; Ophel-Keller, K. y Hughes, R.J. (2011) *Influence of antimicrobial feed additives on broiler commensal posthatch gut*

microbiota development and performance. Appl. Environ. Microbiol. 77: 3380 - 3390.

Tuomola, E.; Crittenden, R.; Playne, M.; Isolauri, E. y Salminen, S. (2001) *Quality assurance criteria for probiotic bacteria*. Am. J. Clin. Nutr. 73: 393 - 398.

Van Der Wielen, P.W.J.J.; Keuzenkamp, D.A.; Lipman, L.J.A.; Van Knapen, F. y Biesterveld, S. (2002) *Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth*. Microb. Ecol. 44: 286 - 293.

Vázquez, J.A.; González, M.P. y Murado, M.A. (2005) *Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish*. Aquaculture. 245: 149 - 161.

Verna, E.C. (2010) *Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend?* Therap. Adv. Gastroenterol. 3: 307 - 319.

Vinderola, C.G.; Bailo, N. y Reinheimer, J.A. (2000) *Survival of probiotic microflora in Argentinian yogurths during refrigerated storage*. Food Res. Int. 33: 97 - 102.

Vinderola, C.G.; Medici, M. y Perdigón, G. (2004). *Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria*. J. Appl. Microbiol. 96: 230 - 243.

Wang, Y. y Gu, Q. (2010) *Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of Arbor Acres broilers*. Res. Vet. Sci. 89: 163 - 167.

Warris, P.D.; Wilkins, L.J.; Brown, S.N.; Phillips, A.J. y Allen, V. (2004). *Defaecation and weight of the gastrointestinal tract contents after feed and water withdrawal in broilers*. Br. Poult. Sci. 45: 61 - 66.

Willis, W.L. y Reid, L. (2008) *Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and Campylobacter jejuni presence*. Poult. Sci. 87: 606 - 611.

Yeo, J. y Kim, K. (1997) *Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic, or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks*. *Poult. Sci.* 76: 381 - 385.

Yin, Y.; Lei, F.; Zhu, L.; Li, S.; Wu, Z.; Zhang, R.; Gao, G.F.; Zhu, B. y Wang, X. (2009) *Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression*. *Multidiscip. J. Microb. Ecol.* 4: 367 - 376.

Yu, Q.H.; Dong, S.M.; Zhu, W.Y. y Yang, Q. (2007) *Use of green fluorescent protein to monitor Lactobacillus in the gastro-intestinal tract of chicken*. *FEMS Microbiol. Lett.* 275: 207 - 213.

Zhou, J.S.; Shu, Q.; Rutherford, K.J.; Prasad, J.; Gopal, P.K. y Gill, H.S. (2000) *Acute oral toxicity and bacterial translocation studies on potentially probiotic strains of lactic acid bacteria*. *Food Chem. Toxicol.* 38: 153 - 61.

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

Zhu, X.Y. y Joerger, R.D. (2003) *Composition of microbiota in content and mucus from cecae of broiler chickens as measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes*. *Poult. Sci.* 82: 1242 - 1249.