



Caracterización molecular y determinación del carácter probiótico de las bacterias ácido lácticas aisladas del microbioma gastrointestinal del pollo en crecimiento

Molecular characterization and determination of the probiotic character of lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal microbiome of the growing chicken

Baylon-Cuba, Miluska Vanessa^{1,2,3}

Fabian-Domínguez, Fredy^{1,2,4*}

Apaestegui-Livaque, Rosel³

Mialhe, Eric²

Vásquez-Rojas, Lourdes^{1,2}

¹Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes, Perú

²INCABIOTECA, Tumbes, Perú

³Universidad Nacional Hermilio Valdizan, Huánuco, Perú

⁴Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú

Recibido: 05 May. 2022 | **Aceptado:** 15 Jun. 2022 | **Publicado:** 20 Jul. 2022

Autor de correspondencia*: ffabian@unsm.edu.pe

Cómo citar este artículo: Baylon-Cuba, M, V., Apaestegui-Livaque, R., Vásquez-Rojas, L., Fabian-Domínguez, F. & Mialhe, E. (2022). Caracterización molecular y determinación del carácter probiótico de las bacterias ácido lácticas aisladas del microbioma gastrointestinal del pollo en crecimiento. *Revista de Veterinaria y Zootecnia Amazónica*, 2(2), e395. <https://doi.org/10.51252/revza.v2i2.395>

RESUMEN

La microbiota gastrointestinal del pollo, es un componente primordial de la producción avícola en términos fisiológicos, zootécnicos y veterinarios. A nivel mundial, estudios relacionados al microbiota del pollo se presentan como una prioridad principal del sector avícola con investigaciones enfocadas a los microorganismos probióticos y/o patógenos. En el marco del presente trabajo, se logró el aislamiento en medio Man Rogose and Sharpe de 32 cepas de bacterias ácido lácticas a partir de la microbiota gastrointestinal. La secuenciación parcial del ARNr 16S permitió la identificación molecular de estas 3 cepas bacterianas ácido lácticas provenientes del ventrículo (*Weissella sp.*), del ciego (*Pediococcus pentosaceos* y *Enterococcus faecium*). Para determinar su carácter probiótico, dichas cepas bacterianas fueron evaluadas basándose en pruebas de resistencia al ácido (pH 2,5; 3,5 y 5), bilis (0; 0,10; 0,15 y 0,30 %) y de antagonismo *in vitro* contra *Salmonella typhimurium*. Los resultados contribuyen a la disponibilidad de nuevas cepas probióticas para el sector productivo avícola y a la modernización de las tecnologías de caracterización e identificación molecular de los microorganismos del microbiota del pollo.

Palabras clave: ARNr 16S; bacterias ácido lácticas; microbiota; pollo

ABSTRACT

The gastrointestinal microbiota of the chicken is a fundamental component of poultry production in physiological, zootechnical and veterinary terms. Worldwide, studies related to the chicken microbiota are presented as a main priority of the poultry sector with research focused on probiotic and / or pathogenic microorganisms. In the framework of the present work, the isolation was achieved in Man Rogose and Sharpe medium of 32 strains of lactic acid bacteria from the gastrointestinal microbiota. The partial sequencing of the 16S rRNA allowed the molecular identification of these three lactic acid bacterial strains from the ventricle (*Weissella sp.*), from the cecum (*Pediococcus pentosaceos* and *Enterococcus faecium*). To determine their probiotic nature, these bacterial strains were evaluated based on acid resistance tests (pH 2.5, 3.5 and 5), bile (0, 0.10, 0.15 and 0.30%) and *in vitro* antagonism against *Salmonella typhimurium*. The results contribute to the availability of new probiotic strains for the poultry production sector and to the modernization of the technologies for characterization and molecular identification of the microorganisms of the chicken microbiota.

Keywords: 16S rRNA; lactic acid bacteria; microbiota; chicken



1. INTRODUCCIÓN

Según la Asociación Peruana de Avicultura (APA) el consumo per cápita de carne de pollo en el Perú fue de 43 kg en el 2016. Durante mucho tiempo, los antibióticos son usados como promotores del crecimiento animal, pero su utilización amplia y muy seguido generó graves problemas de resistencia bacteriana e incentivó la aparición de efectos residuales en los alimentos para el consumo humano (Baurhoo et al., 2009; Franz et al., 2011).

No obstante, a diario incrementa la cantidad de antibióticos que se prohíben como promotores del crecimiento animal. Debido a esto se realizó necesariamente la investigación y adición de aditivos, los probióticos, en las tareas de alimentación y manejo, que atribuyen a prevenir consecuencias malas de la utilización de antibióticos en la producción animal (De Man et al., 1960; Fayol-Messaoudi et al., 2005; Eckburg et al., 2005)

Los probióticos son microorganismos de utilización acelerado en la alimentación, estas son soluciones de bacterias o levaduras que se otorgan de manera oral o se incorporan en los alimentos; las cepas más productoras de ácido láctico son: *Lactobacilos*, *Streptococcus*, *Bacillus spp*, *levaduras*, enzimas y biomasa (Eckert et al., 2010; Watson & Preedy, 2013)

Las bacterias ácido lácticas son bacterias Gram positivas, inmóviles, no esporulados, en forma de cocos o bacilos. Son fermentadores de carbohidratos con elaboración de ácido láctico como utilidad fundamental o exclusiva del consumo de las hexosas (Singh et al., 2011); (Stiles & Holzapfel, 1997); (Suskovic et al., 1997).

Casi todos son buenos debido a su capacidad antagonista contra bacterias patógenos la mayoría usadas como probióticos (Fayol-Messaoudi et al., 2005; Eckburg et al., 2005; Eckert et al., 2010). Actualmente, gracias a la biotecnología, se plantea a los probióticos como solución para ofertar el incremento en los animales (Tilsala-Timisjärvi & Alatossava, 1997); (Torres & Zarazaga, 2002).

El objetivo del presente estudio fue, aislar y caracterizar molecularmente bacterias ácido lácticas del tracto gastrointestinal del pollo y evaluar las cepas aisladas in vitro como antagonistas contra una cepa de *Salmonella typhimurium* patogénica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Para este estudio se escogió completamente al azar un pollo de 15 días de edad procedente de una granja de la ciudad de Tumbes, alimentado con alimento comercial, sin el uso de antibióticos en la dieta.

Toma de muestra del tracto gastrointestinal del pollo

Se sacrificó el ave de acuerdo a las recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Asociación Americana de Médicos Veterinarios (AVMA). De acuerdo al peso del ave (0,5 Kg) y a dosis de Ketamina (10 a 20 mg/Kg), se administró 0.02 mL del fármaco vía intramuscular. Se colocó al ave en posición decúbito dorsal y se realizó la incisión cortando la piel desde la parte ventral del pico hasta la punta del esternón, por la línea media, se separó la piel del tejido subcutáneo hacia ambos lados, hasta exponer los órganos cervicales y las masas musculares del tórax y abdomen, se realizó una segunda incisión para exponer las vísceras, cada región intestinal se abrió longitudinalmente, se procedió a tomar muestras de la mucosa del buche, proventrículo, ventrículo y cinco diferentes regiones intestinales: el duodeno, yeyuno, íleon, colon y ciego (ambos) mediante el hisopado y estos fueron introducidos en tubos que contenían 10 mL de caldo de *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS) (Gauthier, 2005); (Baurhoo et al., 2009) y se almacenaron a temperatura ambiente durante 24 horas.

Aislamiento y purificación bacteriana

Primeramente, se realizó una dilución seriada, del cultivo bacteriano ya crecido se tomó 50 μ L y se adiciono en un tubo con 950 μ L de caldo MRS, se homogeneizó y se tomó nuevamente 50 μ L y se pasó a otro tubo con 950 μ L de caldo, este procedimiento se repitió hasta obtener una dilución a la -10, con el fin de evitar la carga bacteriana. De la dilución existente se tomó 100 μ L y se colocó en las placas Petri, con ayuda de esparcidores estériles se procedió a la siembra en toda la placa y se llevó a incubación 37°C por 24 horas. Luego del crecimiento de las cepas bacterianas, se realizó cuatro purificaciones más en placas Petri con medio agar MRS por el método de estrías.

Después de la cuarta purificación se seleccionó una colonia bacteriana de acuerdo a su morfología, color, tamaño y se colocó en un microtubo que contenía 950 μ L de caldo MRS y se llevó a incubación 37°C por 24 horas, pasado este tiempo se reactivó las bacterias, se realizó tinción Gram para confirmar la existencia de un sólo tipo bacteriano de colonia aislada. Una vez confirmada se realizaron réplicas de estas como respaldo; tomando para ello 50 μ L de la suspensión bacteriana y colocándola en un nuevo microtubo conteniendo 950 μ L de caldo MRS, se incubó nuevamente bajo los mismos parámetros, se adicionó glicerol al 15% y se almacenaron a -20 °C.

Extracción de ADN genómico

Del cultivo preenriquecido en MRS, se tomó 1,2 mL en un tubo de 1,5 mL y se centrifugó a 10 000 rpm por 2 minutos, se desechó el sobrenadante y 500 μ L de la solución *Buffer Fosfato Salino* (PBS 1X) estéril fue adicionado al sedimento. Se homogenizó durante 7 segundos y se centrifugó a 10000 rpm por 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregó 200 μ L de la solución TE (Tris 1M/ 0,1 EDTA), nuevamente se homogenizo por 7 segundos y se llevó a ebullición durante 10 minutos e inmediatamente se colocó rápidamente sobre el hielo por 5 minutos y seguido de una centrifugación a 10000 rpm por 1 minuto. El sobrenadante fue colocado en un microtubo estéril y se le adicionó 1 μ L de ARNasa e incubado a baño maría a 65°C por 15 minutos. Por último, las muestras de ADN se almacenaron a -20°C hasta su próximo uso.

Espectrofotometría

Para conocer la cantidad y pureza del ADN extraído se utilizó el espectrofotómetro que permite la asimilación de radiación electromagnética en el área del ultravioleta y perceptible del espectro. La muestra capta parte de la radiación percance en esta imagen y otorga el cambio del analito hacia una situación excitado, propagando un rayo de menor fuerza resplandeciente. Este proceso determina el número de luz tomada como trabajo de la extensión de onda aprovechada. Esta absorción, observables e infrarrojas requiere de la armazón de las moléculas y es particularidad de cada elemento químico. Esta técnica emplea haces de radiación de la imagen electromagnético, en el grado UV de 180 a 380 nm y en el destello evidente de 380 a 780 nm, por lo que es de mayor interés para calificar los insumos en la región ultravioleta y visible del espectro para ello usamos 1 μ L luego se presiona el botón de lectura y se limpia nuevamente con un papel absorbente para la lectura de la nueva muestra.

Reacción de la cadena polimerasa - PCR

Las reacciones fueron configuradas en un volumen final de 25 μ L, conteniendo: 2,5 μ L de Buffer 10 por (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, pH 8,3), 2,5 μ L MgCl₂ a 25mM, 0,5 μ L dNTPs a 10mM, 16,2 μ L Agua ultra pura, 0,6 μ L Primer Forward 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') y 0,6 μ L Primer Reverse 1492R (3' GGT TAC CTT GTT ACG ACTT 5') del Gen 16S ARNr, 0,1 μ L Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 2 μ L de ADN bacteriano. Seguido por una programación para 35 ciclos, con temperatura de pre-desnaturalización de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación 58°C por 45 segundos, polimerización 72°C por 1min, además de un paso final de extensión de 72°C por 4 minutos. Todo esto en el termociclador (BIOMETRA UNO-Thermoblock).

Electroforesis

La migración del producto de ADN, se realizó en gel agarosa 1.5% diluido en 200 mL de TAE 1X (tris, acetato y EDTA). Se llevó a ebullición hasta que la agarosa se disuelva completamente, se dejó enfriar por unos minutos y se adicionó 0.5 µg/mL Bromuro de Etidio, se mezcló e inmediatamente se vertió en el molde y se esperó su solidificación, las peinetas y el soporte fueron retirados cuidadosamente, el ADN se mezcló con el tampón de depósito (Azul de Bromofenol) en una relación 5:2 respectivamente y fueron depositados en cada pocillo, se tapó la cubeta y se conectaron los electrodos a la fuente de poder, se programó a 90 voltios y 150 de amperaje en donde el ADN migra de polo negativo al positivo por 30 minutos. Una vez terminado la electroforesis se visualizaron los productos de PCR mediante el transiluminador.

Secuenciación y bioinformática

Primeros internos para la secuenciación: Primer Forward F518 (5'CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG 3'), Primer Reverse R800 (5' TAC CAG GGT ATC TAA TCC 3'). La muestra de la ampliación de ADN fue secuenciada por un equipo secuenciador de la empresa Macrogen. Los datos secuenciados fueron comparados con la secuencia depositada en la Base de datos (GenBank, 1988), utilizando la longitud de alineación básica Herramienta de búsqueda.

Actividad antibacteriana

Se realizó por el método de difusión en agar, se utilizaron placas Petri conteniendo agar Nutritivo, sobre este medio se sembró 20 µL de *Salmonella typhimurium*, en una concentración aproximada de $1,2 \times 10^9$ UFC/ mL (Absorbancia 600 nm: 0.1). Se usaron discos de papel filtro Whatman N° 1 de 6 mm de diámetro esté-riles, estos fueron impregnados con 10 µL de cada cepa bacteriana: *W. sp*, *P. pentosaceos* y *E. faecium*, posteriormente se colocaron sobre la superficie de las placas. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas, luego se realizó la lectura midiendo el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de las bacterias. El antibiótico ampicilina (10 ug por disco) fue usado como control positivo.

Resistencia a pH ácido

Se reactivaron las bacterias en 5 mL de caldo MRS y se incubaron a 37°C por 12 horas, se preparó medios con diferentes concentraciones de pH ácido 2,5%, 3,5% y 5%, se tomó 2 mL de cada concentración y se adicionaron a otros tubos de 15 mL por triplicado, luego se adicionaron 200 µL de cada cepa bacteriana y se incubó a 37°C por 12 horas. Pasado este tiempo se realizó la medición del crecimiento bacteriano mediante el espectrofotómetro.

Microscopía confocal

Se utilizó la tinción con fluorocromos, El SYTO9 es un ingresa a través de las membranas de bacterias viables y presenta una fluorescencia verde, el fluorocromo ioduro de propidio (PI) ingresa en aquellas bacterias que presentan las membranas celulares dañadas o con lesiones y proporcionando fluorescencia roja, se tomó 1000 µL de la muestra sometidas a pH ácido a un nuevo tubo de 1,5mL, se centrifugó a 10000 rpm por 2 minutos, se retiró 800 µL del sobrenadante a otro nuevo tubo y se adicionó 1 µL de la mezcla de fluorocromos SYTO9 y PI en proporción 1:1 y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Luego, se tomó una alícuota de 15 µL y se depositó en un portaobjetos cubierto con un cubreobjetos y fueron visualizados en un microscopio confocal.

Resistencia a la bilis

Se recolectó bilis de pollo, posteriormente se filtraron con filtros N° 0,2 mm, se realizó 3 concentraciones de bilis 0,10%, 0,15% y 0,30% v/v en caldo MRS por triplicado, se adicionaron 100 µL de cada cepa bacteriana: *Weissella sp*, *Pediococcus pentosaceos* y *Enterococcus faecium* a cada tubo de 1,5 mL, se incubó

a 37 °C por 12 horas. Pasado este tiempo se comprobó la sobrevivencia y resistencia a bilis mediante la lectura de la densidad óptica.

Análisis estadísticos

Se cuantificó, tabuló y ordenó los datos con la acción de un software libre, además de la utilización del programa bioinformática que se obtuvieron mediante análisis de secuencias, estos lograron deducir los resultados obtenidos.

3. RESULTADOS

Identificación macroscópica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de un pollo

Se aislaron un total de 32 bacterias provenientes del buche 5, proventrículo 3, ventrículo 5, duodeno 3, yeyuno 8, íleon 2, ciego 3 y colon 3. Se observó un crecimiento óptimo de las colonias incubadas a condiciones anaeróbicas por 12 horas, las colonias presentaron diferentes tamaños: pequeñas, medianas y grandes, las otras características morfológicas, es decir, formaciones circulares, elevación convexa, borde lisa y color crema fueron iguales para todas. Las imágenes de las colonias se presentan en la figura.

Tabla 1. Cantidad de cepas bacterianas aisladas de diferentes segmentos de TGI

Segmento del tracto gastrointestinal	Cantidad de cepas aisladas
Buche	5
Proventrículo	3
Ventrículo	5
Duodeno	3
Yeyuno	8
Íleon	2
Ciego	3
Colon	3

Identificación microscópica de bacterias ácido lácticas "BAL" aisladas

Mediante la tinción Gram para bacterias se logró evidenciar la pureza de las cepas y definir sus características en forma de cocobacilo y se tiñeron de azul violeta típicas características de bacterias Gram positivas.

Identificación molecular de las cepas bacterianas

Según el banco de datos de secuencias Genbank.

Tabla 2. Identificación de las cepas bacterianas

Compartimiento del tubo gastrointestinal	Identificación taxonómica	Porcentaje de identidad
Ventrículo	<i>Weissella</i> sp	100%
Ciego	Ciego	Ciego
	Ciego	Ciego

Análisis de la actividad antibacteriana

Las pruebas de antagonismo se realizaron con las cepas, *Weissella* sp, *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus faecium* contra *Salmonella typhimurium*. La cepa bacteriana que muestra mayor halo inhibitorio es *W. sp*, seguido de *P. pentosaceus* y en menor tamaño *E. faecium* con respecto al mix de las tres cepas. El diámetro de halo inhibitorio no varía en relación al tiempo.

Tabla 3. Cepas bacterianas y tamaño de halo inhibitorio contra *S. typhimurium*

Bacterias ácido lácticas	Halo inhibitorio (mm)
<i>Weissella sp</i>	18
<i>Pediococcus pentosaceos</i>	17
<i>Enterococcus faecium</i>	10
Mix de bacterias	8
Control	22

Prueba de resistencia a la bilis

La cepa bacteriana que muestra mayor resistencia a la bilis en concentraciones de 0,5%, 1% y 3% es *Weissella sp*, seguido de *Enterococcus faecium*, y *P. pentosaceus*. (a), (b) y (c) indica que hay diferencia significativa entre las cepas bacterianas y el grupo control a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 4. Crecimiento bacteriano a una densidad óptica (OD) de 600 nm a diferentes concentraciones de bilis

Bacterias ácido lácticas	Concentración de bilis			
	Control 0%	0,10%	0,15%	0,30%
<i>Weissella sp</i>	3	2,3	2,2	2,2
<i>Pediococcus pentosaceos</i>	3	3	2,1	1,9
<i>Enterococcus faecium</i>	3	3	2,2	2,1

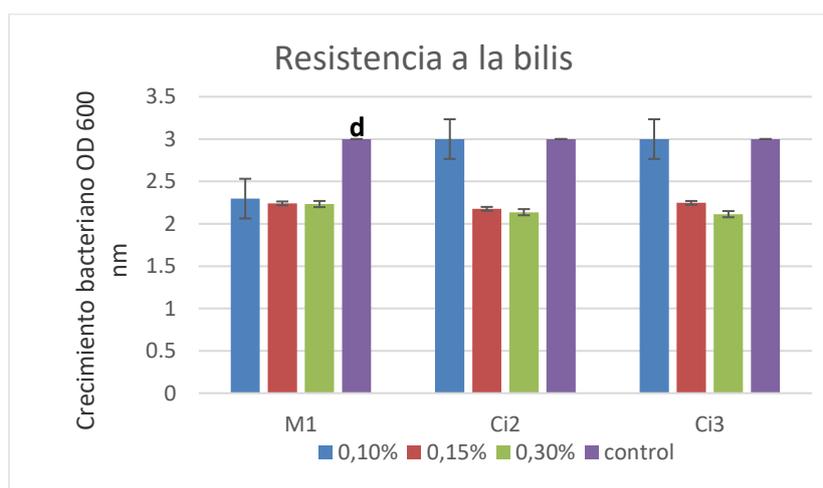


Figura 1. Resistencia a la insulina

Prueba de la resistencia a la bilis a concentraciones de 0,10%, 0,15% y 0,30%. M1= *Weissella sp*, Ci2= *Pediococcus pentosaceos*, Ci3= *Enterococcus faecium*.

Prueba de resistencia a pH ácido

A esta prueba la cepa bacteriana *Weissella sp*., mostro mayor resistencia a las tres diferentes concentraciones de pH de 2,5; 3,5 y 5,0, *Pediococcus pentosaceos*, evidencio una ligera resistencia y en menor proporción la cepa *Enterococcus faecium*. (a), (b) y (c) muestran que hay diferencia significativa entre estas cepas bacterianas y el grupo control a un margen de confianza del 95%.

Tabla 5. Crecimiento bacteriano a una densidad óptica (OD) de 600 nm

Cepa bacteriana	Concentraciones de pH ácido			
	Control pH 0	pH 5.0	pH 3.5	pH 2.5
<i>Weissella sp</i>	3	2,5	0,8	0,4
<i>Pediococcus pentosaceos</i>	3	2,6	0,5	0,3
<i>Enterococcus faecium</i>	3	2,2	0,2	0,1

A diferentes concentraciones de pH ácido de 5,0; 3,5 y 2,5

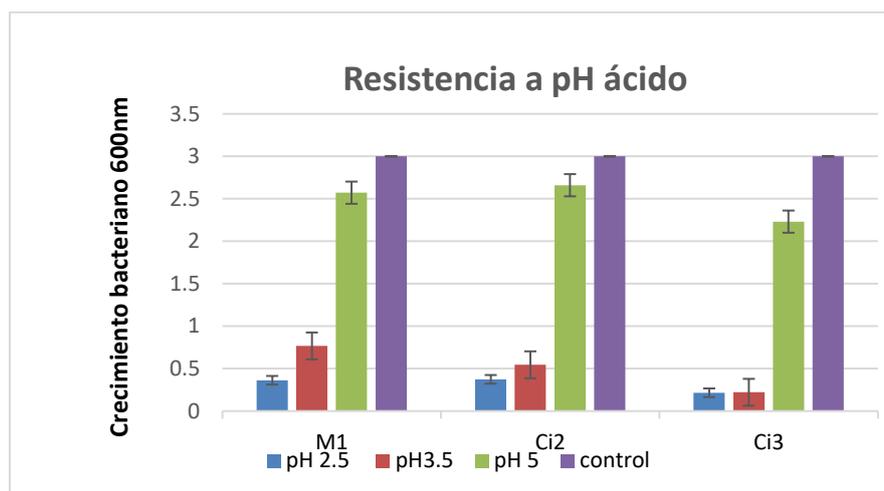


Figura 2. Resistencia a pH ácido

Prueba de resistencia a diferentes concentraciones de pH ácido: 5,0; 3,5 y 2,5; M1= *Weissella sp*, Ci2= *Pediococcus pentosaceus*, Ci3= *Enterococcus faecium*.

Viabilidad bacteriana a pH ácido con microscopía confocal

Las 3 cepas bacterianas evaluadas en condiciones normales de su crecimiento a pH de 5, se mantienen viables. A medida que baja el pH la viabilidad disminuye, quedando viable a pH 3,5 la cepa *P. pentosaceus* seguido de *Weissella sp*, y en menor proporción *E. faecium* y ninguna viable a pH de 2,5.

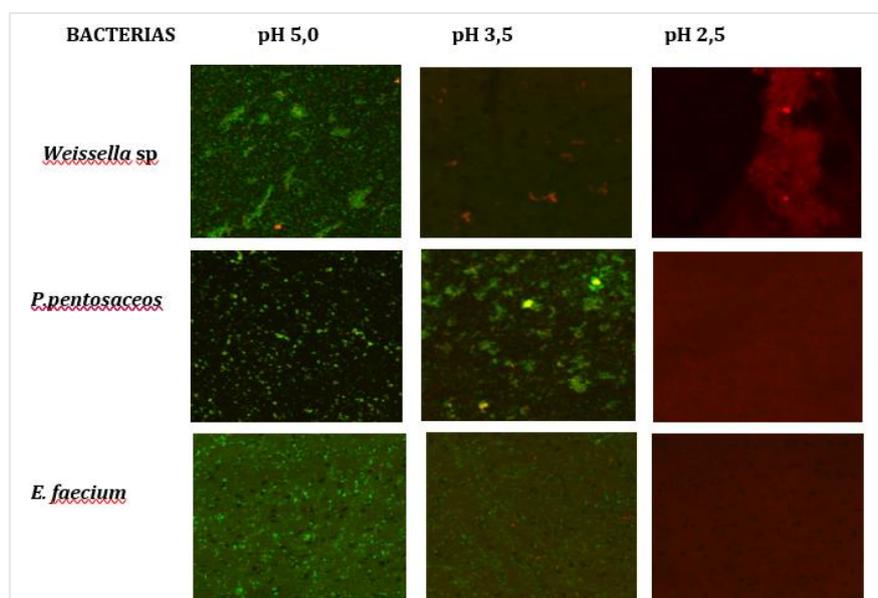


Figura 3. Observación al microscopio confocal de la viabilidad bacteriana a diferentes pH. Las bacterias viables marcadas con SYTO9 se observan de color verde, mientras las bacterias no viables, marcadas con PI se observan de color rojo

Observación al microscopio confocal de la viabilidad bacteriana a diferentes pH. Las bacterias viables marcadas con SYTO9 se observan de color verde, mientras las bacterias no viables, marcadas con PI se observan de color rojo.

4. DISCUSIÓN

Se ha vuelto de suma importancia identificar microorganismos con técnicas altamente confiables como las moleculares que son una herramienta rápida y segura utilizada en la identificación de muchos microorganismos.

El aislamiento de bacterias ácido lácticas del pollo para ser utilizadas en la misma especie es primordial por la particularidad del hospedero, consolidando su sistema inmunológico, simplificando la colonización de microorganismos benéficos y su acción probiótica, concordando con los estudios de (Quigley, 2010); (Gauthier, 2005); (Ssefidi & Ghoorchi, 2006); (Ararsa & Solomon, 2019); (Messaoudi et al., 2013). Estas bacterias nativas forman una opción basada en la restricción de la expansión de patógenos en el intestino, es decir la “exclusión competitiva”.

Existen muchos microorganismos en el tracto gastrointestinal del pollo, los más abundantes son las bacterias ácido lácticas, los resultados obtenidos tras el proceso de identificación de *Pediococcus pentosaceos* y *Enterococcus faecium* seleccionadas por la técnica PCR, coinciden con los referidos por (Fayol-Messaoudi et al., 2005), quienes aislaron estas cepas de bacterias ácido lácticas del ciego de pollos.

En el estudio se observó que los géneros *Weissella sp*, *Pediococcus pentosaceos* y *Enterococcus faecium*, inhiben el crecimiento de *Salmonella typhimurium*, convirtiéndolos más resistentes al medio gastrointestinal y así permitiendo su colonización y multiplicación más beneficiosa en comparación con el microorganismo patógeno. Se ha reportado que las bacterias ácido lácticas se caracterizan por la producción de bacteriocinas además del ácido láctico (Fayol-Messaoudi et al., 2005).

Es interesante que las cepas *Weissella sp*, *Pediococcus pentosaceos* y *Enterococcus faecium*, evaluadas en la presente investigación toleran diferentes concentraciones de pH durante 24 horas, ya que existen hallazgos en donde la cepa *Lactobacillus acidophilus* solo puede sobrevivir durante 3 horas a estas concentraciones de pH, produciéndose luego la lisis del 60 % de la población inicial (Telleza et al., 2012; Tilsala-Timisjärvi & Alatossava, 1997).

La resistencia al ácido puede basarse a la presencia de proteínas especializadas que catalizan el pase de cationes monovalentes (Na^+ o K^+) e H^+ a través de las membranas, regulando las cantidades de cationes y el pH a nivel citoplasmático y de organelos (Mitsui et al., 2005). Otro de los probables mecanismos de regulación es a través de la enzima ATPasa situada en la membrana citoplasmática. Esta puede crear un gradiente electroquímico de protones que llevan al transporte secundario de solutos y que está relacionado en el mantenimiento del pH cercano a la neutralidad (Viegas et al., 1998; Wichers, 2009).

De acuerdo a los resultados obtenidos de la tolerancia a bilis se puede decir, que las tres cepas nativas son microorganismos que tienen la capacidad de tolerar concentraciones de bilis desde 0,1% hasta 0,3 %, logrando ejecutar sus funciones metabólicas sin ser completamente inhibidas, común en microorganismos aislados de aves de corral.

5. CONCLUSIONES

Se obtuvieron 3 cepas nativas pertenecientes a los géneros: *Weissella sp*, *Pediococcus pentosaceos* y *Enterococcus faecium*, las tres cepas mostraron tolerancia a condiciones del tracto gastrointestinal como: crecimiento a diferentes concentraciones de pH, diferentes concentraciones de bilis e inhibición del patógeno.

Los resultados obtenidos in vitro demuestran que las tres cepas nativas poseen propiedades probióticas y pueden ser utilizadas como aditivos microbianos destinados a la alimentación de pollos recién eclosionados, para ayudar a su microbiota intestinal benéfica, estimular su sistema inmune, inhibir el

crecimiento de patógenos oportunistas. Sin embargo, se requieren más pruebas bioquímicas in vitro y estudios in vivo para validar sus efectos benéficos.

La aplicación de bacterias probióticas hará más eficiente el uso y consumo de alimento balanceado para obtener una mejor ganancia.

FINANCIAMIENTO

Proyecto de investigación realizado con los fondos de la empresa INCABIOTEC.

CONFLICTO DE INTERESES

No existe ningún tipo de conflicto de interés relacionado con la materia del trabajo.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Conceptualización: Baylon-Cuba, M.; Apaestegui-Livaque, R., Vásquez-Rojas, L., Fabian-Domínguez, F. y Mialhe, E.

Curación de datos: Baylon-Cuba, M.; Apaestegui-Livaque, R., Vásquez-Rojas, L., Fabian-Domínguez, F. y Mialhe, E.

Análisis formal: Apaestegui-Livaque, R., Vásquez-Rojas, L., Fabian-Domínguez, F. y Mialhe, E.

Investigación: Baylon-Cuba, M.; Fabian-Domínguez, F.; Vásquez-Rojas, L. y Mialhe, E.

Metodología: Baylon-Cuba, M.; Vásquez-Rojas, L.; Fabian-Domínguez, F. y Mialhe, E.

Supervisión: Apaestegui-Livaque, R. y Mialhe, E.

Validación: Baylon-Cuba, M. y Fabian-Domínguez, F.

Redacción - revisión y edición: Baylon-Cuba, M. y Fabian-Domínguez, F.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ararsa, B., & Solomon, D. (2019). Review on the effect of probiotics in poultry production industry. *Research, Academic Research Journal of Agricultural Science And*, 7(6), 312–318. <https://doi.org/10.14662/ARJASR2019.029>
- Baurhoo, B., Ferket, P. R., & Zhao, X. (2009). Effects of diets containing different concentrations of mannanoligosaccharide or antibiotics on growth performance, intestinal development, cecal and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers. *Poultry Science*, 88(11), 2262–2272. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00562>
- De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
- Eckburg, P. b., Bik, E. m., Bernstein, C. n., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. r., Nelson, K. e., & Relman, D. a. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, 308(5728), 1635–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>
- Eckert, N. H., Lee, J. T., Hyatt, D., Stevens, S. M., Anderson, S., Anderson, P. N., Beltran, R., Schatzmayr, G., Mohnl, M., & Caldwell, D. J. (2010). Influence of probiotic administration by feed or water on growth parameters of broilers reared on medicated and nonmedicated diets. *Journal of Applied Poultry Research*, 19(1), 59–67. <https://doi.org/10.3382/japr.2009-00084>
- Fayol-Messaoudi, Domitille Berger, Cédric N Coconnier-Polter, M.-H., Liévin-Le Moal, V., & L Servin, A. (2005). PH-, Lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic Lactobacilli against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6008–6013. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6008-6013.2005>

- Franz, C., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., & Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2).
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014>
- Gauthier, R. (2005). *La Salud Intestinal: Clave de la Productividad - El Caso de los Ácidos Orgánicos (Jefe Nutrition Inc.)*. Avicultura. <https://www.engormix.com/avicultura/foros/salud-intestinal-clave-productividad-t3528/>
- GenBank. (1988). *Base de datos de secuencias genéticas de NIH*. The National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Messaoudi, S., Manai, M., Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J.-M., & Dousset, X. (2013). Lactobacillus salivarius: bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology*, 36(2), 296–304.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.010>
- Mitsui, K., Yasui, H., Nakamura, N., & Kanazawa, H. (2005). Oligomerization of the Saccharomyces cerevisiae Na⁺/H⁺ antiporter Nha1p: Implications for its antiporter activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1720(1–2), 125–136.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.11.005>
- Quigley, E. (2010). Prebiotics and probiotics modifying and mining the microbiota. *Investigación Farmacológica*, 61(3). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.01.004>
- Singh, K., Kallalib, B., Kumar, A., & Thaker, Av. (2011). Probiotics: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), S287–S290. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60174-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60174-3)
- Ssefidi, A., & Ghoorchi, T. (2006). Effect of Probiotic on Performance and Immunocompetence in Broiler Chick. *The Journal of Poultry Science*, 49(3), 296–300. <https://doi.org/10.2141/jpsa.43.296>
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1–29. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(96)01233-0)
- Suskovic, J., Brkic, B., Matosic, S., & Maric, V. (1997). Lactobacillus acidophilus M92 as potential probiotic strain. *Milchwissenschaft (Alemania)*, 52(8), 430–435. <https://doi.org/https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DE1997893704>
- Telleza, G., PixleyBR, C., WolfendenbS, E., Laytona, L., & Hargisa, B. M. (2012). Probiotics/direct fed microbials for Salmonella control in poultry. *Food Research International*, 45(2), 628–633.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.047>
- Tilsala-Timisjärvi, A., & Alatossava, T. (1997). Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 35(1), 49–56. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(97\)88066-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(97)88066-x)
- Torres, C., & Zarazaga, M. (2002). Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino? *Gaceta Sanitaria*, 16(2), 109–112.
https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-91112002000200002
- Viegas, C. A., Almeida, P. F., Cavaco, M., & Correia, S. (1998). The H(+)-ATPase in the plasma membrane of Saccharomyces cerevisiae is activated during growth latency in octanoic acid-supplemented medium accompanying the decrease in intracellular pH and cell viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 779–783. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.779-783.1998>
- Watson, R., & Preedy, V. (2013). Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases. In *Arthritis and Related Inflammatory Diseases*. (2nd ed., pp. 357–370).
<https://doi.org/10.1016/C2011-0-07467-7>

- Wichers, H. (2009). Immunomodulation by food: promising concept for mitigating allergic disease? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 37–45. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2838-1>
- GenBank. (1988). *Base de datos de secuencias genéticas de NIH*. The National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Messaoudi, S., Manai, M., Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J.-M., & Dousset, X. (2013). Lactobacillus salivarius: bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology*, 36(2), 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.010>
- Mitsui, K., Yasui, H., Nakamura, N., & Kanazawa, H. (2005). Oligomerization of the Saccharomyces cerevisiae Na⁺/H⁺ antiporter Nha1p: Implications for its antiporter activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1720(1–2), 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.11.005>
- Quigley, E. (2010). Prebiotics and probiotics modifying and mining the microbiota. *Investigación Farmacológica*, 61(3). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.01.004>
- Singh, K., Kallalib, B., Kumar, A., & Thaker, Av. (2011). Probiotics: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), S287–S290. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60174-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60174-3)
- Ssefidi, A., & Ghoorchi, T. (2006). Effect of Probiotic on Performance and Immunocompetence in Broiler Chick. *The Journal of Poultry Science*, 49(3), 296–300. <https://doi.org/10.2141/jpsa.43.296>
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1–29. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(96)01233-0)
- Suskovic, J., Brkic, B., Matosic, S., & Maric, V. (1997). Lactobacillus acidophilus M92 as potential probiotic strain. *Milchwissenschaft (Alemania)*, 52(8), 430–435. <https://doi.org/https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DE1997893704>
- Telleza, G., PixleybR, C., WolfendenbS, E., Laytona, L., & Hargisa, B. M. (2012). Probiotics/direct fed microbials for Salmonella control in poultry. *Food Research International*, 45(2), 628–633. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.047>
- Tilsala-Timisjärvi, A., & Alatossava, T. (1997). Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 35(1), 49–56. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(97\)88066-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(97)88066-x)
- Torres, C., & Zarazaga, M. (2002). Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino? *Gaceta Sanitaria*, 16(2), 109–112. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-91112002000200002
- Viegas, C. A., Almeida, P. F., Cavaco, M., & Correia, S. (1998). The H(+)-ATPase in the plasma membrane of Saccharomyces cerevisiae is activated during growth latency in octanoic acid-supplemented medium accompanying the decrease in intracellular pH and cell viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 779–783. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.779-783.1998>
- Watson, R., & Preedy, V. (2013). Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases. In *Arthritis and Related Inflammatory Diseases*. (2nd ed., pp. 357–370). <https://doi.org/10.1016/C2011-0-07467-7>
- Wichers, H. (2009). Immunomodulation by food: promising concept for mitigating allergic disease? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 37–45. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2838-1>