

Artículo original

Aislamiento, selección e identificación de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico y tecnológico del tracto digestivo de pollos de traspatio

Fátima Arteaga Chávez^{a,*}, Marta Laurencio Silva^b, Ana Julia Rondón Castillo^b, Grethel Milián Florido^b, Ramón Bocourt Salabarría^c

^aLaboratorio de Biología Molecular, Escuela Superior Politécnica de Manabí, Ecuador. ^bCentro de Estudios de Biotecnología, Universidad de Matanzas, Cuba. ^cInstituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba.

Recibido 11 de julio de 2017; aceptado 20 de marzo de 2018

Resumen: El uso de probióticos en la avicultura constituye una alternativa a la aplicación de antibióticos como promotores del crecimiento animal. El objetivo del presente trabajo fue obtener cepas de lactobacilos con potencial probiótico y tecnológico, a partir de la mucosa cecal de pollos de traspatio. Para el aislamiento bacteriano se utilizaron las porciones de ciego intestinal de cuatro aves adultas y las bacterias se seleccionaron según su comportamiento en la disminución del pH del medio (< 4,5), resistencia a pH ácido (pH 2) y sales biliares (1,5 g.L⁻¹), capacidad de crecimiento y producción de ácidos. Las cepas seleccionadas se identificaron por la técnica de PCR y se caracterizaron de acuerdo a su crecimiento en condiciones extremas de temperatura (15, 35, 45 °C), pH (3, 4, 7) y concentración de NaCl (2, 5, 8 %). Como resultado se aislaron 100 cepas, de ellas 54 mostraron características de *Lactobacillus* spp. Se seleccionaron las cepas 17LP y 40LP con posible capacidad probiótica, las cuales fueron identificadas como *Lactobacillus brevis*, ya que mostraron la capacidad de crecer en condiciones adversas de pH, temperatura y concentraciones de NaCl. Se concluyó que las cepas 17LP y 40LP tienen potencial para ser utilizadas como probióticas.

Palabras clave: probióticos, PCR, *Lactobacillus brevis*, pollos de traspatio.

Isolation, selection and identification of *Lactobacillus* spp. with probiotic and technological potential, from digestive tract of backyard chickens

Abstract: The use of probiotics in poultry farming is an alternative to the use of antibiotics as promoters of animal growth. The objective of the present work was to obtain strains of lactobacilli with probiotic and technological potential, from the cecal mucosa of poultry. For the bacterial isolation, the intestinal caecum portions of four adult birds were used and the bacteria were selected according to their behaviour in reducing pH of the medium (<4.5), resistance to acid (pH 2) and bile salts (1.5 gL⁻¹), growth capacity and acid production. The selected strains were identified by the PCR technique and characterized according to their growth under extreme conditions of temperature (15, 35, 45 °C), pH (3, 4, 7) and NaCl (2, 5, 8 %). Results: 100 strains were isolated, of which 54 showed characteristics of *Lactobacillus* spp. Strains 17LP and 40LP with possible probiotic capacity were selected, which were identified as *Lactobacillus brevis*, as they showed the ability to grow under adverse conditions of pH, temperature and NaCl concentrations. It was concluded that strains 17LP and 40LP have potential to be used as probiotics.

Keywords: probiotics, PCR, *Lactobacillus brevis*, backyard chickens.

* Correspondencia:
E-mail: fatimitaespam@yahoo.es

Introducción

En numerosas granjas avícolas de Ecuador se continúa con la aplicación de antibióticos para prevenir la generación de enfermedades o como promotores del crecimiento animal (PCA). Este procedimiento aún aparece en el

Manual de Aplicabilidad de Buenas Prácticas Avícolas para la crianza del pollo de engorde, como parte de lo legislado en la Resolución N° 0017 por la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (MAGAP) [1].

Con la prohibición del uso de los antibióticos como PCA en muchos países, aumentó el interés de los investigadores por encontrar nuevas estrategias para mantener la salud y la productividad de los pollos, pero a la vez, satisfacer las demandas de los consumidores de carne sana y segura. Los probióticos, que son cultivos microbianos vivos, se consideran una buena alternativa a los antibióticos, ya que su uso en dietas para aves de corral se asocia con efectos positivos en la salud y en el crecimiento de las aves [2].

En medio de este contexto, en la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Ecuador, se trabaja por introducir en los sistemas de producción animal nuevos productos probióticos para la obtención de alimentos más sanos y que al mismo tiempo, permitan obtener altas producciones con sostenibilidad económica adecuada.

Dentro de las especies probióticas de mayor interés se encuentran los lactobacilos, los cuales se utilizan ampliamente en la elaboración de estos biopreparados; sin embargo, para su empleo, es necesario realizar una adecuada selección de cepas, de forma tal que los microorganismos colonizadores permanezcan en estado viable y en cantidades suficientes, una vez que superan el medio ácido del estómago y la presencia de bilis en el tracto intestinal [3].

Para obtener cepas probióticas se deben utilizar animales sanos, libres del consumo de antibióticos, por lo que el tracto digestivo de las aves de traspatio resulta ideal para el aislamiento, ya que estos microorganismos están adaptados a las condiciones físicas, químicas y biológicas de este ecosistema, sin la interferencia de antibióticos que provoquen la generación de genes de resistencia.

El objetivo del presente trabajo fue obtener cepas de lactobacilos con potencial probiótico y tecnológico, a partir de su aislamiento en la porción del ciego intestinal de pollos de traspatio.

Materiales y métodos

Toma y procesamiento de las muestras: Se utilizaron cuatro aves de traspatio (*Gallus gallus*) sanos de 45 días de edad, con dieta libre de antibióticos, que se sacrificaron por desviación cervical según Sánchez [4]. De estas aves se extrajeron las porciones del ciego intestinal y se tomó 1 g de raspado de la mucosa. Inmediatamente las muestras fueron colocadas en matraces de 50 mL con 9 mL de agua de peptona (Oxoid, España) en atmósfera de CO₂ al 5% y se colocaron en un agitador (Innova 4000) a 150 rpm durante 10 min a 37 °C para el desprendimiento de las bacterias.

A partir de las muestras anteriores, se realizaron diluciones seriadas hasta el valor de 10⁻¹² en agua de peptona y las diluciones 10⁻¹⁰, 10⁻¹¹ y 10⁻¹² se sembraron en tres placas de Petri con agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS), según De Mann *et al.* [5], las cuales se incubaron durante 48 h a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente se seleccionaron las colonias típicas, caracterizadas por disminuir el pH en el medio del cultivo y su relación con la capacidad de crecimiento de la cepa. Además mostraron resistencia a

la prueba de sales biliares. Posteriormente se sembraron en 10 mL del medio semisólido tioglicolato (DIFCO) con carbonato de calcio (0,1 g por tubo) para su crecimiento y conservación. Además, se preservaron en el Banco de Cepas del Laboratorio de Biología Molecular, en leche (10%) y glicerol (20%) en condiciones de crioconservación a -80 °C.

Preselección de cepas: Se realizaron dos pruebas: tinción de Gram y prueba de la catalasa. Se eligieron las cepas cuyas células fueron morfológicamente bacilos grampositivos y catalasa negativa [6].

Disminución del pH en caldo MRS: Las cepas preseleccionadas se sembraron en tubos de cultivo con 10 mL de caldo MRS (Condo, España) a pH 6,5 y posteriormente fueron incubadas por 24 h a 37 °C. A partir de estos cultivos se tomó 1 mL de muestra para inocular matraces con 50 mL de caldo MRS, a razón de 1:10 mL. Todas se incubaron por 24 h a 37 °C en condiciones estáticas. De cada réplica se tomaron muestras para medir el pH de los cultivos con pHmetro digital (Sartorius Meter PP-25). Se utilizó como criterio de selección, aquellas cepas que redujeran el pH hasta valores ≤ 4,5.

Resistencia a pH ácido del estómago in vitro: Las cepas se cultivaron en caldo MRS a pH 6,5 por 18 h a temperatura de 37 °C. Seguidamente de cada cultivo, se tomó 1 mL con 10⁹ UFC mL⁻¹ y se inoculó en caldo MRS a pH 2, ajustado con HCl 0,1 N incubándose a 37 °C por 3 h [7]. Paralelamente se hicieron los controles, con caldo MRS a pH 6,5 bajo las mismas condiciones. Antes de la incubación (hora 0) y después de esta (hora 3), se realizó el conteo de células viables mediante la técnica de las diluciones seriadas en caldo peptona al 1% y la siembra en placas con agar MRS (10⁻⁶-10⁻⁸). El efecto de la acidez se estimó al comparar el conteo de colonias en agar MRS para la hora 0 y después de la incubación a pH ácido por 3 h [8]. Se estableció como criterio de selección aquellas cepas en las que más del 50% de sus células se mantuvieran viables, después de pasar por estas condiciones. La ecuación propuesta por Kociubinski *et al.* [9] se utilizó para determinar el porcentaje de resistencia a pH ácido.

$$\% R \text{ pH} = \left[\frac{(\text{UFC/mL})_{\text{MRS pH } 2.0} \times 100}{(\text{UFC/mL})_{\text{MRS pH } 6}} \right]$$

Resistencia a las sales biliares in vitro: Las cepas se cultivaron en caldo MRS a pH 6,5 por 18 h a temperatura de 37 °C. Seguidamente de cada cultivo, se tomó 1 mL con 10⁹ UFC mL⁻¹ y se inoculó en tubos con caldo MRS ajustado con 1,5 g.L⁻¹ de Ox-Bilis (OXOID) y sin sales biliares (controles), los que se incubaron a 37 °C por 3 h [10]. La tolerancia a las sales biliares se estimó al comparar el conteo de las UFC con y sin sales biliares, después de realizar diluciones seriadas y la siembra en agar MRS a las cero y tres horas. Se determinó el porcentaje de sobrevivencia con respecto al control, mediante la ecuación propuesta por Ouwehand *et al.* [11].

$$\% \text{ R sales biliares} = \left[\frac{(\text{UFC/mL})_{\text{MRS + sales}} \times 100}{(\text{UFC/mL})_{\text{MRS}}} \right]$$

Capacidad de crecimiento: Las cepas que resistieron la presencia de pH ácido y sales biliares se cultivaron en caldo MRS a 37 °C por 24 h, con el objetivo de evaluar su capacidad de crecimiento en el tiempo. Para el conteo se empleó el método de las diluciones seriadas en agua de peptona al 1% y la siembra en placas en agar MRS (10^{10} - 10^{12}), las cuales se incubaron a 37 °C en 5% de CO₂. Posteriormente se realizó el conteo de las UFC.

Determinación de ácido láctico: Se realizó por colorimetría utilizando la técnica propuesta por Taylor [12].

Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y totales: Los ácidos acético, propiónico, butírico y totales se determinaron utilizando un cromatógrafo Krom gas-líquido y detector de llama, como lo describieron Kumprecht *et al.* [13].

Identificación molecular: Se utilizó la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La extracción de ADN de las cepas 17LP y 40LP se realizó por el método de Handerson *et al.* [14]. La amplificación y secuenciación del ADN para las cepas de *Lactobacillus* se realizó como lo describieron Tannock *et al.* [15].

El ADN amplificado se purificó a partir de la extracción directamente del gel de agarosa de la banda de peso molecular entre 300 a 400 pb y se realizó una nueva PCR. Las muestras fueron secuenciadas en la Universidad de León, España, con un secuenciador automático ABIPRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y comparadas con la base de datos internacional GenBank utilizando la herramienta BLAST [16].

Efecto de la temperatura y pH extremo: Las cepas de lactobacilos se inocularon al 1% en caldo MRS y se incubaron a 15, 37 y 45 °C, respectivamente, durante 24 h. También se cultivaron a 37 °C en caldo MRS a pH 3; 4; 6,5 y 7. El crecimiento bacteriano se cuantificó a las 0 y a las 3 h.

Tolerancia a altas concentraciones de NaCl: Las cepas se cultivaron en caldo MRS en presencia de 2, 5, 8% de NaCl (p/v) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. El crecimiento bacteriano se cuantificó de igual manera que el efecto de la temperatura y pH extremos.

Análisis estadístico: Para el análisis de los resultados se utilizó el programa estadístico INFOSAT, versión 1 [17]. En la verificación de las diferencias se utilizó la prueba de comparación de Duncan [18]. Todos los datos presentados son valores medios de tres determinaciones.

Resultados y discusión

Aislamiento de las cepas: Del raspado de la mucosa cecal se

aislaron 100 cepas, de las cuales 54 resultaron grampositivas, no esporuladas y catalasa-negativas. De acuerdo con estas características, las mismas fueron preseleccionadas como representantes del género *Lactobacillus*, según la información que se describe en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [19]. Los aislados de lactobacilos de la mucosa cecal estaban en el orden de 10^{11} a 10^{12} UFC.g⁻¹, lo cual demuestra que estos microorganismos colonizan este tejido y están entre los grupos más abundantes del tracto gastrointestinal [20].

Disminución del pH: De las 54 cepas seleccionadas, 34 disminuyeron el pH a valores $\leq 4,5$ en 24 h de incubación (Tabla 1). Esta cualidad se debe a que las bacterias ácido

Tabla 1. Cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de mucosa cecal de pollos de traspatio que redujeron el pH a $\leq 4,5$.

Cepas	pH	Cepas	pH
19LP	4,0	37LP	3,8
2LP	4,3	38LP	4,5
40LP	4,5	43LP	3,8
23LP	3,7	41LP	3,8
6LP	4,0	42LP	3,9
7LP	4,4	25LP	4,4
8LP	4,5	26LP	4,4
45LP	4,5	47LP	4,1
28LP	3,7	46LP	3,8
11LP	3,9	29LP	4,3
12LP	3,9	30LP	3,8
13LP	3,8	31LP	4,5
32LP	4,2	48LP	4,5
15LP	3,9	33LP	4,5
34LP	4,1	52LP	3,9
17LP	3,7	35LP	3,9
36LP	3,8	49LP	3,7

láticas producen ácidos orgánicos (ácido láctico, acético, butírico, propiónico) que inhiben el crecimiento de la mayoría de los patógenos a un pH $\leq 5,5$ [21].

Resistencia a pH ácido y sales biliares: La tabla 2 muestra los resultados de resistencia a pH 2 y a sales biliares de los lactobacilos. Solamente las cepas 2LP, 6LP, 7LP, 8LP, 15LP, 17LP, 28LP, 35LP, 37LP, 40LP, 41LP, 43LP, 45LP, 46LP resistieron el pH ácido y las condiciones extremas de sales biliares por encima del 50%.

Esta prueba constituye un criterio de selección importante si se toma en cuenta que el jugo gástrico de los pollos y patos puede llegar a valores tan bajos de pH como 0,5 – 2,0

Tabla 2. Porcentaje de resistencia a pH 2 y sales biliares al 1,5% por 3 horas de cepas de lactobacilos aisladas de mucosa cecal de pollos de traspatio.

Cepas	%R pH	%R SB	Cepas	%R pH	%R S.B
2LP	59,6	63,3	32LP	48,5	-
6LP	65,6	60,9	33LP	37,7	-
7LP	52,2	73,5	34LP	45,9	-
8LP	55,0	72,4	35LP	82,5	74,2
11LP	40,0	-	36LP	44,2	-
12LP	44,9	-	37LP	80,2	74,8
13LP	37,1	-	38LP	42,6	-
15LP	77,5	71,8	40LP	87,3	90,4
17LP	85,6	88,3	41LP	72,7	64,6
19LP	47,2	-	42LP	38,7	-
23LP	39,9	-	43LP	78,2	79,0
25LP	37,4	-	45LP	69,4	69,2
26LP	31,2	-	46LP	64,6	65,8
28LP	60,1	56,2	47LP	37,0	-
29LP	48,6	-	48LP	28,1	-
30LP	47,3	-	49LP	26,0	-
31LP	31,5	-	52LP	34,2	-

Los resultados son el promedio de tres determinaciones. %R pH- Porcentaje de resistencia a pH 2; %R SB- Porcentaje de resistencia a las sales biliares.

[22].

Las sales biliares actúan como detergentes y desestabilizan los lípidos presentes en la membrana citoplasmática. Esta situación trae como consecuencia la formación de poros que perturban la integridad y la fisiología de las células, lo cual puede provocar la muerte [23]. Con los resultados de este estudio se puede considerar que las cepas evaluadas pudieran ser potencialmente probióticas, ya que podrían transitar el tracto digestivo de las aves y facilitar de este modo la colonización de este ecosistema.

Autores como Reque *et al.* [24] evaluaron la cepa *Lactobacillus plantarum* LPB a altas concentraciones de sales biliares (3 y 10%) y observaron que las células sobrevivieron a estas condiciones. Resultados similares obtuvieron Rondón y Laurencio [25] al evaluar 20 cepas de *L. salivarius* aisladas de pollos de ceba y todas resistieron estas condiciones drásticas de pH 2 y presencia de sales biliares (1,5 g/L⁻¹) durante 3 h.

Capacidad de crecimiento: En la figura 1 se aprecia que las cepas 17LP y 40LP tuvieron mejor capacidad de crecimiento ($p \leq 0,05$) que el resto de las 14 candidatas. Esta es una propiedad que caracteriza a las cepas probióticas, ya que deben presentarse en cantidades suficientes para llegar al tracto gastrointestinal (TGI), resistir los impedimentos

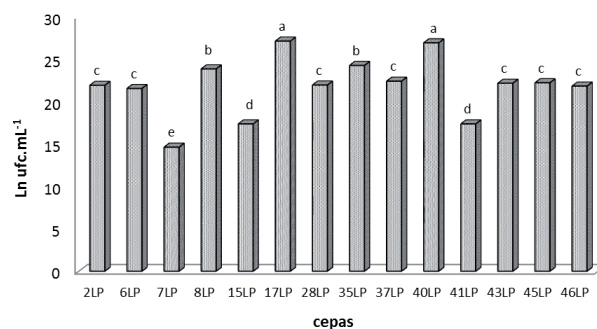


Figura 1. Capacidad de crecimiento de *Lactobacillus* spp. en caldo MRS a 37 °C durante 24 h. a,b,c,d,e: Columnas con letras diferentes difieren para $p < 0,05$ [19]. *** $p < 0,001$, EE $\pm 0,043$.

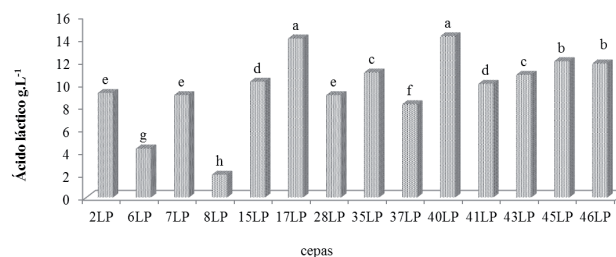


Figura 2. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus* spp. en caldo MRS a 37 °C durante 24 h. a,b,c,d,e,f,g,h: Columnas con letras diferentes difieren para $p < 0,05$ [19]. *** $p < 0,001$, EE $\pm 0,28$.

químicos que allí se encuentran y ser capaces de establecerse para lograr una buena colonización de la mucosa y el contenido intestinal [26].

Al mismo tiempo es indispensable que las bacterias probióticas posean alta capacidad de producción de ácido láctico (Figura 2), que reduzca el pH intestinal y acelere las reacciones bioquímicas de la digestión. Se conoce que en las bacterias ácido lácticas, específicamente en las homofermentativas, predomina la producción de ácido láctico y que este incide directamente en la eliminación de las bacterias indeseables a nivel del tracto gastrointestinal, tales como *Salmonella* y *Escherichia coli* [27]. En este trabajo se encontró que las mismas cepas que presentaron alta capacidad de crecimiento mostraron valores superiores a 14 g.L⁻¹ en la producción de ácido láctico.

En la figura 3 se muestra la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), totales y fraccionados de las cepas a las 24 h de incubación en caldo MRS. Los valores de ácido acético se encontraron entre 120-125 mmol.L⁻¹ para las cepas 40LP y 17LP, siendo superior en la 17LP ($p \leq 0,05$). El ácido propiónico se produjo entre 0,5-0,6 mmol.L⁻¹ en ambas cepas, el ácido butírico resultó de 0,2 mmol.L⁻¹ para las dos cepas y los AGCC totales resultaron superiores en la cepa 17LP (125 mmol.L⁻¹) en relación al producido por la cepa 40LP (121 mmol.L⁻¹). La producción de estos ácidos orgánicos por determinados grupos de microorganismos contribuye a la regulación del desarrollo celular y a la diferenciación, además de tener efectos tróficos o nutritivos sobre el epitelio intestinal, lo cual favorece la recuperación

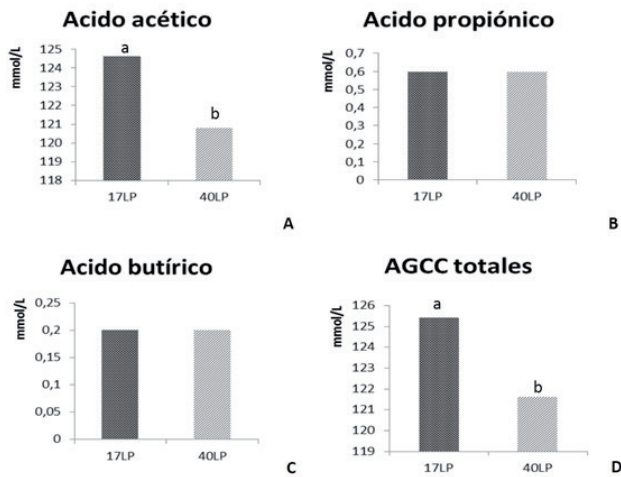


Figura 3. Producción de ácido acético (A), butírico (B), propiónico (C) y totales (D). a, b: Columnas con letras diferentes difieren para $p < 0,05$ [19]. A: EE $\pm 0,55$; B: EE $\pm 0,86$; C: EE $\pm 0,65$ y D: EE $\pm 0,76$.

de los efectos inflamatorios y la reducción de los riesgos de translocación bacteriana durante la alteración de la barrera intestinal [28].

Los AGCC que se producen en el TGI se metabolizan en la mucosa y se transportan eficientemente, por lo que cantidades considerables pueden llegar a sangre para su utilización posterior. Se considera que el aporte de estos ácidos es de 25-30% para los requerimientos energéticos del mantenimiento en cerdos, 50% en conejos y 17% en pollos. De manera que si se produce en el intestino un incremento de los AGCC, habrá mayor biodisponibilidad de estas sustancias como fuente de energía [25]. También estos ácidos, principalmente el ácido propiónico, pueden inhibir la síntesis de colesterol en el hígado [29].

Identificación molecular de las cepas 17LP y 40LP: Las secuencias 17LP y 40LP presentaron un 99 y 98 % de identidad respectivamente con *L. brevis* al compararlas con secuencias registradas en la base de datos del GenBank (MG383788.1 y MG383789.1) Se destaca la presencia de *L. brevis* en las aves de traspatio, a diferencia de las aves expuestas a crianza intensiva, donde predomina la especie *L. salivarius* [30].

En la tabla 3 se observa el efecto de diferentes niveles de pH, temperatura y concentraciones de NaCl sobre el crecimiento de las dos cepas seleccionadas. Se comprobó que las mismas crecieron a pH 3, con un aumento a pH 7; esto demuestra que crecieron en un rango amplio de pH y pueden adaptarse a sobrevivir y crecer a pH extremos, lo cual contribuye al aumento de la absorción de proteínas y de la eficiencia digestiva.

En relación al crecimiento en las diferentes temperaturas, se produjo crecimiento en todas las evaluadas, lo cual es una característica importante para proliferar en el tracto gastrointestinal y mantenerse termoestables, permanecer viables sin afectaciones negativas y además permite que se utilicen en procedimientos tecnológicos donde se empleen

Tabla 3. Capacidad de crecimiento de las cepas de lactobacilos aisladas de mucosa cecal de pollos de traspatio seleccionadas en diferentes condiciones tecnológicas.

Indicadores	Crecimiento (Log_{10} UFC.mL ⁻¹)						
	17LP		40LP				
	DE	CV	DE	CV			
pH	3	22,92	1	9	23,12	1,41	6,38
	4	23,12	1	11	25,59	1	13
	7	26,07	1	21	26,20	1	24
Temperatura (°C)	15	14,94	1	31	16,82	1,52	13,35
	35	26,14	2,08	10,89	25,61	1,52	8,76
	45	25,89	2,51	7,03	26,32	1,52	18,85
NaCl (%)	2	25,83	1,52	10,96	26,03	1,52	13,17
	5	23,25	2,51	5,04	23,25	0,57	22,21
	8	23,49	2,08	6,88	23,59	2,51	7,03

Log_{10} : Logaritmo decimal; DE: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación; 17LP- cepa 17 de *Lactobacillus* de pollo; 40LP- cepa 40 de *Lactobacillus* de pollo.

altas temperaturas.

Las dos cepas mostraron crecimiento ante las diferentes concentraciones de NaCl, aunque la población disminuyó en presencia de 8% de NaCl. Esta propiedad les confiere un uso agregado, para que puedan emplearse en la industria como preservantes de carnes, vegetales y probióticos.

Conclusiones

Las cepas 17LP y 40LP procedentes de la mucosa cecal de pollos de traspatio, resistieron *in vitro* las barreras ácidas y biliares, presentaron alta capacidad de crecimiento y elevada producción de ácidos. Las mismas fueron identificadas como *L. brevis*, y se consideran candidatas a probióticos en aves.

Agradecimientos

Al proyecto de colaboración Cuba-Ecuador: Obtención de cultivos microbianos con actividad probiótica y de sustancias prebióticas para animales de interés zootécnico y en especial a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Ecuador.

Referencias

- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (MAGAP). Guía de buenas prácticas avícolas. Resolución técnica N° 0017, 2013; Disponible en: <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2016/08/guia-avicola.pdf>. Acceso: noviembre de 2017.
- Popova T. Effect of probiotics in poultry for improving meat quality. *Curr Opin Food Sci.* 2017; 14:72-7.

3. Rosminiet MR, Sequeira GJ, Guerrero-Legarreta I, Martí LE, Dalla-Santina R, Frizzo L, Bonazza JC. Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Rev Mex Ing Quím.* 2004; 3:181-91.
4. Sánchez A. Enfermedades de las aves. La Habana: Editorial ENPES; 1990.
5. DeMan JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Bacteriol.* 1960; 23:130-5.
6. Rondón AJ, Milián G, Arteaga FG, Bocourt R, Ranilla MJ, Riaño J, Samaniego LM, Rodríguez Z, Pérez M, Rodríguez M. Identificación y actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* de origen avícola. *Rev Cienc Agric.* 2012; 46:403-9.
7. Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cell. *J Dairy Sci.* 1987; 70:1-12.
8. Tsai CC, Hsih HY, Chiu HH, Lai YY, Liu JH, Yu B, Tsen HY. Antagonistic activity against *Salmonella* infection *in vitro* and *vivo* for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. *Int J Food Microbiol.* 2005; 24:33-8.
9. Kociubinski G, Pérez P, De Antoni G. Screening of bile resistance and bile of precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Food Protect.* 1999; 62:905-12.
10. Milián G. Obtención de cultivos de *Bacillus* spp. y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (*Gallus gallus domesticus*). Tesis. La Habana Cuba: Instituto de Ciencia Animal; 2009.
11. Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Short C, Salminen S. Probiotics: mechanism and established effects. *Intern Dairy J.* 1999; 9:43-52.
12. Taylor K. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochem Biotech.* 1995; 56:49-58.
13. Kumprecht P, Zobac Z, Gasnarek Z, Rovosova E. The effect of continuous application of probiotics preparations based on *Saccharomyces cerevisiae* var. *elipsoideus* and *Streptococcus faecium* C-68 (SF 68) on chicken broilers yield. *Zirocisna Vyroba.* 1994; 5:491-503.
14. Henderson G, Cox F, Kittelmann S, Miri VH, Zethof M, Noel SJ, Waghorn GC, Janssen PH. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. *PLoS ONE.* 2013; 8:74-8.
15. Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Munro K, Alatosava T. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65:4264-7.
16. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res.* 1997; 25:3389-402.
17. Belzarini MG, Casanoves F, Di Rienzo JA, González LA, Robledo CW. INFOSTAT, Versión 1. Córdoba, Argentina. 2001.
18. Duncan B. Multiples ranges and multiple F tests. *Biometrics.* 1955; 11:1-42.
19. Kandler O, Weiss N. Genus *Lactobacillus*. In: Sneath PH, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986. pp. 1209-34.
20. Dec M, Puchalski A, Urban-Chmiel R, Wernicki A. Screening of *Lactobacillus* strains of domestic goose origin against bacterial poultry pathogens for use as probiotics. *Poul Sci.* 2014; 93:2464-72.
21. Milián G, Rondón AJ, Samaniego LM, Riaño J, Bocourt R, Ranilla MJ, Carro DM, Rodríguez M, Laurencio M. Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus* spp. en diferentes ecosistemas con fines probióticos. Su utilización en animales. *Rev Cub Cienc Agr.* 2014; 48:347-51.
22. Mantilla C, Burgos A. Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. *Rev Colomb Biotecnol.* 2012; 14:31-40.
23. Pérez M, Laurencio M, Rondón AJ, Milián G, Bocourt R. Actividad antimicrobiana de una mezcla probiótica de exclusión competitiva y su estabilidad en el tiempo. *Rev Sal Anim.* 2011; 33:147.
24. Reque E, Pandey A, Franco SG, Socol CR. Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* LPB for use as probiotic in chickens. *Brazilian J Microbiol.* 2003; 31:303-7.
25. Rondón AJ, Laurencio M. Utilización de las mezclas de exclusión competitiva en la avicultura moderna. *Rev Cienc Agríc.* 2008; 42:3-11.
26. Salminen S, Laine M, von Wright A, Vuopio-Varkila L, Korhonen T, Mattila-Sandholm T. Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: a nordic and european approach. *BioSci Microflora.* 1996; 15:61-70
27. Pérez M, Milián G, Rondón AJ, Bocourt R, Torres V. Efecto de endosporas de *Bacillus subtilis* E-44 con actividad probiótica sobre indicadores fermentativos e inmunológicos de pollos de engorde. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2015; 35:89-94.
28. Laurencio M. Obtención y caracterización de una mezcla de exclusión competitiva de microorganismos cecales de pollos de ceba y evaluación *in vivo* de su efecto probiótico. Tesis. La Habana. Cuba: Instituto de Ciencia Animal; 2010.
29. Souza MR, Moreira JL, Barbosa FHF, Cerqueira MMOP, Nunes AC, Nicoli JR. Influence of intensive and extensive breeding on lactic acid bacteria isolated from *Gallus gallus domesticus* cecal. *Vet Microbiol.* 2007; 120:142-50.
30. Gancel F, Dzierszynski F, Tailliez R. Identification and characterization of *Lactobacillus* species isolated from fillets of vacuum-packed smoked and salted herring (*Clupeaharengus*). *J Appl Microbiol.* 1997; 82:722-8.