

Evaluación de la adherencia de bacterias ácido-lácticas al epitelio intestinal de pollos alimentados con probióticos

Luz Adriana Gutiérrez Ramírez*, Luz Adriana Ramírez Arias**

Resumen

Introducción. El consumo de probióticos genera una influencia positiva en la salud del hospedero y mejora su productividad, susceptibilidad a patógenos y conversión alimentaria entre otras. **Objetivo.** se buscó identificar por técnicas microbiológicas y moleculares, la adherencia de bacterias nativas con actividad probióticas suministradas en la dieta a pollos de engorde **Metodología.** Se utilizaron 103 pollos divididos en tres lotes, un lote fue el control; el segundo se alimentó con concentrado sin antibióticos promotores de crecimiento y con las bacterias probióticas, más levaduras; el tercero se alimentó con concentrado sin promotores de crecimiento pero con probióticos comerciales (Prokura Poll-S®). Se sacrificó un pollo de cada lote en tres momentos (días 10, 20 y 42), se extrajo el ciego de cada uno y se diluyó hasta 10^{-2} inoculándose 0,1ml en agar MRS a 37°C/ anaeróticamente/72 horas; al cabo de este tiempo se determinaron unidades formadoras de colonias (UFC), más identificación por Gram. Para la evaluación molecular se realizó extracción de ADN con kit QIAGEN y amplificación de la región 16s de ADNribosomal por PCR, para identificar las bacterias adheridas. Resultados: se determinó que el conteo de UFC aumenta en el tiempo: se encontraron en el último recuento 352 UFC en el primer lote; en el segundo, 1604 UFC, y en el tercero, 1260 UFC, correspondientes a *Lacto-*

* Bióloga, magíster em Biotecnología. Grupo de Investigación en Producción, Desarrollo y Transformación Agropecuaria, Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Corporación Universitaria Lasallista, Caldas, Antioquia, Colombia.

** Zootecnista, magíster en bosques y conservación ambiental. Grupo de Investigación en Medicina Veterinaria (GIVET), Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Corporación Universitaria Lasallista, Caldas, Antioquia, Colombia.

bacillus y se obtuvo el ADN bacteriano, pero la región de ADNr no amplificó. **Conclusiones.** se evidenció un aumento de las UFC en los recuentos evaluados pero la especies bacterianas no se determinaron molecularmente porque necesitan técnicas más sensibles para su estudio.

Evaluation of the acid lactic bacteria adhesion to the intestinal epithelium in chickens fed with probiotics

Abstract

Introduction. The consumption of probiotics have a positive influence in the host organism's health and increases its productivity, sensitiveness to pathogens and alimentary conversion, among other benefits. **Objective.** To identify, by the use of microbiological and molecular techniques, the adhesion of native bacteria with probiotic activity in the diet given to broilers. **Methodology.** 103 chickens, divided into three groups, were used. One of them was taken as a control. The second was fed with concentrated food without growth boosting antibiotics, and with probiotic bacteria, plus yeast. The third group was fed with concentrated food without growth boosters, but with commercial probiotics (Prokura Poll-S®). A chicken from every group was slaughtered in three moments (days 10, 20 and 42), and the cecum of each chicken was extracted and diluted until 10^{-2} , inoculating 0,1ml in MRS agar at 37°C/anaerobically/72 hours. After this period, colony forming units (CFU) and identification by Gram were determined. For the molecular evaluation, DNA was extracted with a QIAGEN kit and by amplifying the 16s region of ribosomal DNA by PCR in order to identify the bacteria attached. **Results.** It was determined that the CFU account augments throughout time. In the last count, 352 CFU were found in the first group; 1604 in the second and 1260 in the third, corresponding to *Lactobacillus*, and the bacterial DNA was obtained, but the rDNA did not get amplified. **Conclusions:** An increase of CFU in the counts evaluated could be seen, but the bacteria species were not molecularly determined because more sensitive techniques are required to study them.

Introducción

La sobrevivencia y el buen desempeño de las aves dependen de la obtención adecuada de energía y compuestos químicos por el organismo; para que esto ocurra es necesario que el tracto digestivo presente características funcionales desde la ingestión de los alimentos hasta su absorción¹.

El tracto digestivo es un mecanismo de defensa natural: en él se encuentra el epitelio intestinal, que actúa como barrera contra bacterias patógenas y/o sus-

tancias tóxicas presentes en el lumen. La microbiota natural del intestino es una población compleja de microorganismos que ejercen una gran influencia sobre el huésped; cerca del 90% de la microbiota intestinal que coloniza el tubo digestivo es permanente; el 10% restante es transitoria; desequilibrios en la microbiota normal o en las células epiteliales intestinales, causados por algún tipo de estrés, patógenos, sustancias químicas y radiación, pueden alterar la permeabilidad de esta barrera y facilitan la invasión de patógenos y otras sustancias nocivas que modifican el metabolismo y la capacidad de digestión y absorción de nutrientes, y llevando a una insuficiente conversión de los alimentos y a una disminución en la respuesta productiva de los animales²⁻⁴.

Adicionalmente, el uso indiscriminado de antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal ha conducido a la aparición de cepas patógenas antibióticos multi-resistentes, lo que genera un problema mayor en la sanidad animal.

Dentro de las soluciones que se han planteado para mitigar esta problemática está la incorporación de cultivos de bacterias probióticas como aditivos promotores de crecimiento, los cuales han mostrado ser efectivos en los trastornos diarreicos y en el crecimiento animal, mejorando la respuesta productiva en éstos.⁵⁻⁷

Los probióticos son definidos por la FAO⁸ (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) como microorganismos vivos que, administrados en adecuadas cantidades, ejercen un efecto beneficioso sobre el huésped. La mayoría de los probióticos son bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque también se emplean algunos otros géneros como *Enterococcus*, *Streptococcus*, y *Saccharomyces* (tabla 1).

El término “probiótico”, derivado de *bios*, palabra griega que significa “vida”, fue utilizado por primera vez en el año 1965 por Lilly y Stillwell¹⁰, a partir de la observación de la influencia positiva que tenían determinados microorganismos en la microbiota intestinal, secretando sustancias que favorecen el crecimiento y desarrollo de otras, en contraposición al término antibiótico.

Fuller¹¹ en 1989 y Flemming¹², en el 2005, describieron a los probióticos como microorganismos vivos que al ser consumidos en cantidades adecuadas generan un efecto protector en la salud del hospedero, hombre o animal, fortaleciendo el sistema inmune intestinal mediante competencia con otras especies y la eliminación de microorganismos patógenos. El grupo de probióticos lo conforman en su mayoría las bacterias ácido-lácticas (BAL); ellas son: Gram-positivas no esporuladas, anaerobias en forma de cocos y bacilos, productoras de ácido láctico como producto final de la fermentación de los carbohidratos.¹³ Los productos probióticos comercializados actualmente se pueden dividir en tres tipos: los alimentos fermentados convencionales a los que se les adicionan probióticos (yogures, leche, quesos, etc.); las leches cultivadas y fermentadas, utilizadas, básicamente, como vehículos de bacterias probióticas (leche acidófila, etc.), y los suplementos dietéticos o preparaciones farmacéuticas liofilizadas¹³.

Tabla 1. Microorganismos empleados como probióticos modificado de Álvarez-Olmos y Oberhelman⁹, 2001)

Lactobacillus spp.	Bifidobacterium spp.	Lactococcus spp.	Streptococcus spp.
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. lactis</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. longum</i>	<i>L. cremoris</i>	
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. breve</i>	<i>L. diacetylactis</i>	
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. lactis/animalis</i>		
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>		
<i>L. kefir</i>			
<i>L. brevis</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. helveticus</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. salivarius</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
Enterococcus spp.	Bacillus spp.	Otras especies	
<i>E. faecium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>E. faecalis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>	
		<i>Leuconostoc spp.</i>	

La viabilidad de los microorganismos es una propiedad de los probióticos durante todo el periodo de vida útil del producto; es por esto que se exige legalmente que en el alimento exista como mínimo de 10^6 - 10^7 células viables/ml o g^{14} .

Asimismo, la correcta identificación de las especies utilizadas y su correlación con las especificadas en el producto es otro aspecto que se debe exigir en cualquier alimento probiótico. Esto requiere la aplicación no sólo de métodos convencionales de identificación, sino también de técnicas moleculares, ya que no siempre es sencillo resolver la posición taxonómica de las cepas probióticas; también es necesario garantizar la existencia de técnicas eficaces que permitan el seguimiento de las introducidas en el mercado.¹⁵ Por ejemplo, en ciertas preparaciones de probióticos liofilizados se han detectado diferencias entre las especies de los géneros *Bifidobacterium* y *Bacillus* declaradas y las detectadas en el producto del mercado, así como la presencia de otras no declaradas¹⁶; estas bacterias se han clasificado regularmente por la morfología y fermentación de carbohidratos; pero estos métodos tienen desventajas al momento de caracterizar en el nivel de especie y sub-especie, por lo cual se deben complementar los métodos tradicionales de identificación, con técnicas taxonómicas moleculares, como la comparación de secuencias de ADN ribosomal (ADNr) utilizando la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) y posterior secuenciación automática a partir del producto de PCR¹⁵

El estudio de las secuencias de ADNr es muy apropiado porque esta molécula contiene regiones muy conservadas y regiones muy variables. Los genes de las regiones 16S y 23S de ADNr se han utilizado para identificar microorganismos

del género *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* de diferentes nichos. La base de datos de secuencias de 16S ADNr de las BAL ha ido creciendo durante los últimos años y se ha convertido en una herramienta muy útil al momento de comparar las secuencias que se obtengan de aislados de cepas nativas¹³.

La ventaja de usar la técnica de PCR es que esta es altamente sensible, menos dispendiosa y con bajo costo, comparada con la técnica de hibridación de ácidos nucleicos, que serviría también para identificación de organismos.

En esta investigación se evaluó por técnicas microbiológicas y moleculares la adhesión de bacterias ácido-lácticas al epitelio intestinal de pollos de engorde alimentados con diferentes dietas suplementadas con microorganismos probióticos.

Materiales y métodos

El proyecto se realizó con 103 pollos de engorde de la línea Ross, de un día de nacidos y todos machos para evitar variaciones de orden fisiológico ligadas al género del animal; éstos fueron cuidados en una granja de San Antonio de Prado, Antioquia, en donde fueron vacunados contra Newcastle, Bronquitis y Gumboro, con dos dosis/vacuna.

Para la experimentación los pollos se dividieron en tres lotes cada uno con 34 pollos, discriminados así: el primer lote fue el control, alimentados con concentrado convencional que contiene antibióticos promotores de crecimiento; el segundo fue alimentado con concentrado sin antibióticos promotores de crecimiento, y con bacterias ácido-lácticas aisladas y caracterizadas en la Corporación Universitaria Lasallista como *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus brevis*, suministrados en el agua de bebida a una concentración de 1×10^8 bacterias/ml, en la misma cantidad se suministró *Saccharomyces cerevisiae*, en tres tiempos diferentes durante los 42 días de producción. La primera dosis se suministró el día que se inició el experimento en la granja (tiempo 0) en un litro de agua. La segunda dosis se suministró el día 9 en la misma concentración, pero en 4 litros de agua; la tercera fue el día 20 en igual concentración que las dosis anteriores, pero en 10 litros de agua. Para tener un patrón de comparación con una marca comercial se alimentó un tercer lote con concentrado sin antibióticos promotores de crecimiento pero con probióticos comerciales (Prokura Poll-S[®]); las concentraciones de los microorganismos contenidos en éste fueron exactamente las administradas en el grupo anterior en los mismos volúmenes y los mismos días; los microorganismos contenidos en éste eran *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus lactis*.

Identificación microbiológica de bacterias ácido lácticas de los pollos

Se realizó el sacrificio de un pollo de un día de nacido para identificar los microorganismos que tuviera el animal antes de iniciar el experimento; la evaluación se realizó directamente en el nivel del ciego; el peso del pollo, fue 0,01g y los medios

de cultivo empleados para el diagnóstico fueron agar MRS suplementado con extracto de levadura; la dilución empleada para el análisis fue de 10^{-2} ; se inoculó por siembra en superficie 0,1ml y se incubó a 37°C anaeróticamente/72 horas; al cabo de este tiempo se realizaron las pruebas de identificación por tinción de Gram

Para la evaluación de los microorganismos adheridos al epitelio intestinal, se sacrificó un pollo de cada tratamiento a los 10, 20 y 42 días del experimento; las muestras de ciego se pesaron, se maceraron y se llevaron a diluciones hasta 10^{-2} , en las mismas condiciones de siembra e incubación que la anterior; posteriormente se realizó conteo de unidades formadoras de colonias y coloración de Gram.

Identificación molecular de bacterias ácido lácticas de los pollos

A partir del ciego extraído de los pollos sacrificados, se realizó extracción de ADN bacteriano, macerando el ciego para seguir el protocolo para bacterias Gram positivas del Kit DNeasy® Blood & Tissue de QIAGEN (2006), con modificaciones en la cantidad de proteinasa utilizada y en el tiempo de incubación que fue de 12 horas. Con este protocolo no se obtuvo ADN de buena calidad. Se optó por partir de cultivos de las bacterias, por lo que se lavó el tejido a presión con agua estéril y se inoculó este producto del lavado en agar MRS, suplementado con extracto de levadura, por siembra en superficie, además de dejar en el medio una pequeña porción de tejido; se incubó a 37°C anaeróticamente/72 horas; al cabo de este tiempo se realizaron las pruebas de identificación por tinción de Gram y aquellas colonias que presentaran las características propias de las bacterias en estudio se tomaron para realizar la extracción con el kit anteriormente mencionado y sin modificaciones. La integridad y la calidad del ADN fueron evaluadas en electroforesis (Cleaver Scientific, UK) en gel de agarosa (Amresco, USA) al 0.8% teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta (Ultralum, Claremont, CA). El ADN fue almacenado a -20°C hasta ser utilizados para la PCR.

Para amplificar la región 16S de ADNr de *Lactobacillus casei* se usaron los primers (Bioneer, USA) LC 5' (CAGACTGAAAGTCTGACGG)3' como Forward y LC 5' (GCGATGCGAATTTCTTTTTC)3' como Reverse¹⁷, y para *Lactobacillus brevis* se usaron los primers (Bioneer, USA) LB 5' (CTTGCACTGATTTTAACA)3' como Forward y LB 5' (GGGCGGTGTGTACAAGGC)3' como Reverse¹⁸. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue realizada en un termociclador MultiGene II (Labnet, USA), con los siguientes componentes: buffer de PCR 1X (200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500mM KCl), 2.5mM MgCl pH 8.0, 0.25 μM de cada dNTP, AmpliTaq DNA recombinant polymerase (1U) (Fermentas, USA), primer F (0.2 μM), primer R (0.2 μM) y ADN molde 2 μl y se completó a un volumen de 50 μl con agua desionizada estéril. El perfil de la reacción fue: desnaturalización inicial de 95°C por 2 min., 94°C por 30 s, seguido de un

anillamiento a 55°C por 30 s para *L. casei* y de 40°C por 1 min para *L. brevis*, extensión a 72°C por 45 s, 30 ciclos a 94°C 30 s, con una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de la amplificación de LC y LB fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% y visualizados por tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta, evaluando la presencia de una banda de 1.3 a 1.5 kb, correspondiente al tamaño promedio de la región 16S de ADNr.

Resultados

Identificación microbiológica

En la evaluación microbiológica del vértice cecal proveniente del pollo con un día de nacido se encontraron colonias correspondientes a *Streptococcus* Gram positivos, bacilos Gram positivos esporulados y *Lactobacillus*; las colonias de bacterias ácido-lácticas se identificaron por ser redondas, pequeñas, umbonadas de bordes enteros y color marfil. No se realizó conteo de unidades formadoras de colonias, debido a la diversidad de colonias encontradas; este primer sacrificio se realizó para determinar qué tipo de población microbiana presentaba el organismo antes de iniciar una dieta determinada.

En el segundo sacrificio se realizó el análisis microbiológico de los ciegos de los tres tratamientos, evaluando el peso inicial del tejido empleado para el análisis; la porción del ciego del primer tratamiento pesó 0,078g; el segundo, 0,1049g, y el tercero, 0,2068g; cada uno de ellos arrojó un conteo determinado en la evaluación de unidades formadoras de colonias. El primer tratamiento presentó 266 colonias correspondientes a bacilos Gram positivos no esporulados o bacterias ácido-lácticas; el segundo presentó 240 unidades formadoras de colonias correspondientes a *Lactobacillus* y 10 colonias de bacilos esporulados Gram positivos. En el tercer tratamiento se contaron 136 unidades formadoras de colonias correspondientes a *Lactobacillus*.

En el tercer sacrificio la evaluación microbiológica se realizó de la misma manera como la anterior: del vértice cecal y con previo pesaje de la porción a evaluar. Los pesos del tejido cecal evaluado fueron 0.2880g para el pollo del primer tratamiento, 0.2328g para el segundo y 0.2109g para el tercero.

Las unidades formadoras de colonias con sus respectivas identificaciones por Gram fueron: para el primer tratamiento se encontró bacterias esporuladas y levaduras, solo 200 UFC correspondían a colonias de *Lactobacillus*.

En la figura 1 correspondiente al segundo tratamiento se contaron 236 colonias de bacterias ácido lácticas o *Lactobacillus*, tal cual como se muestra en la figura 2, donde se aprecian bacilos largos, Gram positivos no esporulados. En el tercer tratamiento, el conteo fue 240 UFC, correspondientes a bacterias Gram positivas no esporuladas o bacterias ácido lácticas y 50 UFC de bacterias Gram positivas esporuladas.

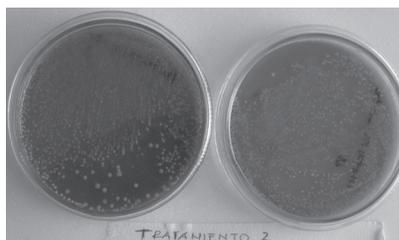


Figura 1. Colonias de *Lactobacillus* en agar MRS



Figura 2. *Lactobacillus* por coloración de Gram

Fotografías tomadas por las autoras

El cuarto sacrificio se realizó el día 42 del experimento, día en el cual se sacan los pollos para el consumo en la producción avícola; la metodología para el análisis fue igual a la realizada en los experimentos anteriores. Los pesos de los ciegos fueron de 0.8500g, 0.6415g y 0.7333g, respectivamente para los tratamientos 1, 2 y 3. El número de colonias contadas para *Lactobacillus* en el primer tratamiento fue de 352 UFC; para el segundo, 1604 UFC, y para el tercero, 1260 UFC, todas correspondientes a *Lactobacillus*; solo en el tratamiento tres se contaron 104 colonias de bacterias Gram positivas esporuladas. En la figura 3 se aprecia la cantidad de colonias de *Lactobacillus*, evidenciando la colonización de estas en el epitelio intestinal. Algunas colonias fueron coloreadas por tinción de Gram y muestran bacilos largos Gram positivos, característica propia de este género.



Figura 3. Colonias de *Lactobacillus* en agar MRS

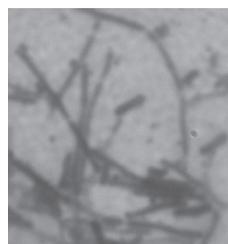


Figura 4. *Lactobacillus* por coloración de Gram

Fotografías tomadas por las autoras

Identificación molecular de bacterias ácido lácticas de los pollos

La extracción de ADN de bacterias ácido-lácticas directamente del epitelio no arrojó resultados positivos, dado que se presentó un “background” de ADN ines-

pecífico a lo largo del gel, que sugería un ADN fragmentado y/o contaminado con otras moléculas como ARN, proteínas e inclusive componentes del epitelio intestinal que no se degradan con el kit. Sin embargo, el ADN extraído directamente de los recuentos microbiológicos se presentó de buena calidad y en cantidad suficiente para realizar la amplificación de la región 16s de ADNr mediante PCR, para identificar los microorganismos en evaluación.

Una vez se realizó la PCR, no se obtuvo amplificado para ninguno de los *Lactobacillus* suministrados en la dieta de los pollos como se aprecia en la figura 5.

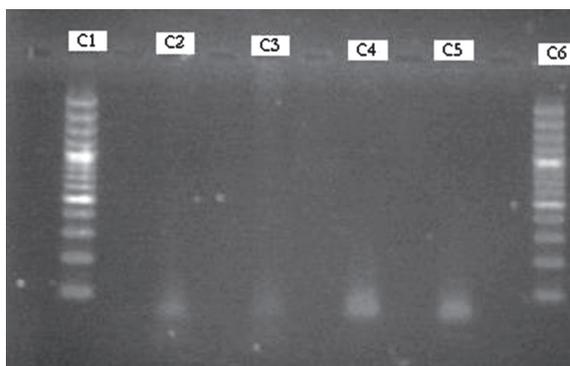


Figura 5. Gel de agarosa con productos de PCR (C1 y C6: carriles con marcador de peso molecular; C2 -C5: carriles con producto inespecífico de PCR extracción de ADN)

Fotografías tomadas por las autoras

Discusión

Al analizar los datos obtenidos por recuento microbiológico en los tres tratamientos durante el tiempo de experimentación se pudo observar que todos presentan bacterias ácido-lácticas como parte de su microbiota natural normal, en algunos bacilos esporulados y levaduras, sin contar con bacterias de otros géneros que no fueron objeto para este estudio.

Los resultados obtenidos en la evaluación inicial muestran que los animales presentan *Lactobacillus* como colonizadores del epitelio al igual que otros microorganismos, como bacilos esporulados y levaduras.

Los resultados de las evaluaciones se muestran en el gráfico 1. En la segunda evaluación se observa que los tratamientos 2 y 3 presentan una población muy similar en el recuento de unidades formadoras de colonias de bacterias lácticas, teniendo en cuenta que fueron éstos los alimentados con suplementos adicionales

y sin antibióticos promotores de crecimiento, además, hubo presencia de bacilos esporulados en el tratamiento dos; de la misma forma se observó un comportamiento similar en los epitelios aislados en el sacrificio tres; sin embargo, en la última evaluación la población de bacterias ácido-lácticas aumentó considerablemente, especialmente en los tratamientos dos y tres; es posible que estos resultados hayan crecido en virtud de la capacidad de división celular que presentaron las bacterias administradas durante todo el tiempo de tratamiento, aumentando significativamente con respecto al blanco no tratado; estos datos se corroboran con los reportados por Jim¹⁶ en 1999 quien encontró que los *Lactobacillus* crecen rápidamente en el intestino; probablemente es la primera población emergente de microorganismos que hace parte del ecosistema intestinal, encargados de acidificar el medio evitando la supervivencia de microorganismos como *E.coli* y *Salmonella*, entre otros, productores de diarreas en animales y en el hombre.

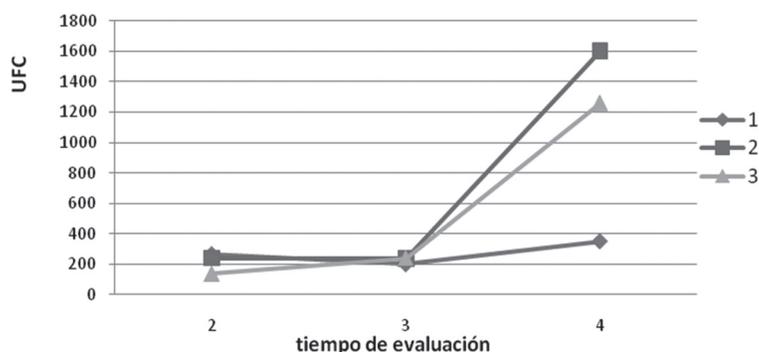


Grafico 1. Evaluación de las UFC de Lactobacillus en diferentes muestreos

Grafico realizado por las autoras

En cuanto a la población de levaduras encontradas, algunos autores como Andrews¹⁹ y Silva²⁰ en el 2000 las ubican dentro del grupo de microorganismos funcionales por su poder fermentativo, su riqueza en vitaminas del grupo B y enzimas hidrolíticas que ayudan al proceso de digestión.

Otro grupo importante son las bacterias esporuladas como *Bacillus cereus*, *toyoi* y *megaterium*, entre otros, empleadas para prevenir los desórdenes y/o mejorar el desarrollo probablemente por la capacidad de producción de enzimas que inhiben el crecimiento microbiano de bacterias patógenas, además de la producción de endosporas, que estimulan el sistema inmune, contribuyendo a la resistencia contra patógenos ambientales.²¹

Nakano²² y Maruta²³ estudiaron los efectos del empleo de un probiótico en pollos de engorde el cual incluía especies de *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus* y *Saccharomyces* en una dosis de 3g/kg de concentrado; el probiótico disminuyó el número de *E.coli* y *Salmonella* en el ciego, y aunque estos estudios no se realizaron en la investigación, sí se encontró que los animales alimentados con bacterias probióticas fueron menos susceptibles a infecciones respiratorias y digestivas.

Estudios realizados por Maruta²³ en 1993 y Bortolozzo²⁴ en 2002, quienes administraron un probiótico a base de *Bacillus subtilis* a pollos de engorde, muestran un aumento de la musculatura y disminución de la grasa abdominal, principalmente en machos, además, observaron que el suministro de este probiótico disminuyó el porcentaje de bacterias patógenas, fundamentalmente *Salmonella* desde un 60 a un 20%.

El aumento más alto de unidades formadoras de colonias fue encontrado en el tratamiento dos, a los 42 días de evaluación en los pollos alimentados con *L. casei*, como se muestra en la grafica 1. Estos estudios fueron también realizados por Huang²⁵ y colaboradores, quienes encontraron mejoras en pollos cuando se empleaban *L. acidophilus* y *L. casei*, efecto también observado por Ángel y colaboradores²⁶ 2005 cuando empleaban concentrados de baja concentración de nutrientes suplementados con *Lactobacillus*.

Finalmente, Morales²⁷ y colaboradores en el 2003 observaron un mayor efecto de la utilización de *Saccharomyces cerevisiae* sobre el crecimiento de los pollos a 42 días en condiciones de campo.

Estudios realizados por Hopkins y colaboradores en 2005²⁸ con PCR en tejido intestinal corroboran los obtenidos en este trabajo, donde no observaron amplificado del ADN cuando solamente se trabajaba con técnicas como PCR y aunque ésta técnica es muy sensible, se necesitaría de PCR en tiempo real o FISH (hibridización por sondas fluorescentes) dado la baja cantidad de ADN que existe en este tipo de muestras.

Conclusiones

En esta investigación se evidenció que hubo adhesión de las bacterias probióticas en el epitelio intestinal de los lotes de pollos suplementados con estos microorganismos, pues mostraron un aumento de las unidades formadoras de colonias en los recuentos evaluados durante todo el tiempo de producción; en cuanto a la evaluación molecular se observó ADN pero no hubo amplificado. Es posible que para este análisis se requieran técnicas moleculares más sensibles.

El empleo de cepas probióticas de origen nativo es una herramienta potencial para mejorar las condiciones sanitarias y de producción de las explotaciones intensivas, más aún cuando son especies específicas.

Agradecimientos

Las autoras agradecen al Fondo de Investigación de la Corporación Universitaria Lasallista por otorgar recursos para llevar a cabo esta investigación (22117), y al Comité de Ética de la Universidad de Antioquia por evaluar y otorgar el permiso para experimentar con animales.

Referencias bibliográficas

1. Romer, A.S. y Parsons, T.S. (1981). Anatomía Comparada. 5 ed. México: Interamericana. 428p.
2. Hofstad, M.S. (1972). Diseases of poultry. 6 ed. Hofstad, M.S. (ed). Ames: The Iowa State University Press. 1176 p.
3. Podolsky, D.K. (1993). Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers, many questions. *AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 264, p. 179-186.
4. Oliveira, P.B. (1998). Influência de fatores antinutricionais de alguns alimentos sobre o epitélio intestinal e o desempenho de frangos de corte. 42f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá.
5. Dobrogsz, W.J., Black, B.L. y Casas, I.A. (1991). Delivery of viable *Lactobacillus reuteri* to the gastrointestinal tract of poultry. *Poultry Science*, 70, p. 158.
6. Bradley, G.L., Savage, T.F. y Timm, K.I. (1994). The effects of supplementing diets with *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* on male poult performance and ileal morphology. *Poultry Science*, 73, 1766-1770.
7. Spring, P. (1996). Effects of mannanoligosaccharide on different cecal parameters and on cecal concentrations of enteric pathogens in poultry. Dissertation (ETH no. 11897). ETH Zurich, Switzerland.
8. FAO/WHO. (2006). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. FAO Food and Nutrition paper 85. P. 1 – 33.
9. Alvarez-Olmos, M.I. y Oberhelman, R.A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin. Infect. Dis.* 32, 1567-1576.
10. Lilly, D.M. y Stillwell, R.H. (1965). Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 147, p. 747-748.
11. Fuller, R. (1989). A review. Probiotics in man and animals. *Journal of applied bacteriology* 66, p. 365–378.
12. Flemming, J.S. y Freitas, R.J.S. (2005). Avaliação do efeito de prebióticos (mos), probióticos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. *Archives of veterinary science*. 10, No. 2, p. 41-47.
13. Axelsson, L. (1998). Lactic Acid Bacteria. Classification and Physiology. En: Salmminen, S. y Von Wright, A. (ed) *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects*. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 617p.

14. Ouwehand, A.C., Salminen, S. e Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 82, p. 279-289.
15. Torriani, S., Zapparoli, G. y Dellaglio, F. (1999). Use of PCR- based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, octubre:4351-4356.
16. Jim D. Garlich. (1999). Microbiología del tracto intestinal aviar. College of Agriculture and life Sciences, USA.
17. Walter, J., Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D.M., Munro, K. y Alatosava, T. (2000). Detection and Identification of Gastrointestinal *Lactobacillus* Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Species-Specific PCR Primers. *Applied and Environmental Microbiology.* 66, No. 1, p. 297-303.
18. Guarneri T., Rossetti, L. y Giraffa, G. (2001). Rapid identification of *Lactobacillus brevis* using the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology.* 33, p. 377-381.
19. Andrews, A.H. (1992). Probiotics and other prophylactic agents. *Ocasional publication - British Society of Animal Production* No. 15. p 119-137.
20. Silva, E., N. (2000). Probióticos e prebióticos na alimentação de aves. *in: conferência apinco de ciência e tecnologia avícola. Anais Campinas*, p.242.
21. Anon. (1998).CHR. Hansem. Byo System. The Worlds microbial experts. Probio: [www. Chrhansen.com](http://www.Chrhansen.com). Infocarne.probióticos en nutrición animal.com.
22. Nakano, T.; Shimuzu, M. y Fukushima. (1999). Effects of a probiotic on the lipid metabolism of pullet hen as a cholesterol- enriched diet. *Biotechnology and Biochemistry.* 63, p. 1569-1575.
23. Maruta, K. y Miyazaki, L.S. (1996). Exclusion of intestinal pathogens by continuous feeding with *Bacillus subtilis* C-3102 and its influence on intestinal microflora in broilers. *Animal Science and Technology Japan.*7, p.273-280.
24. Bortolozo, F. y Kira, K. (2002). Probióticos . Uso de los probióticos na alimentacao de frangos de corte.
25. Huang J.S., Bousvaros, A., Lee, J., Díaz, A. y Davidson, E. (2002). Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. *Dig Dis Sci.* 47 (11): p. 2625-2634.
26. Angel, C.R. y Powers, W.J. (2005). Feeding of chickens with probiotics. *Journal Environmental Quality.* 34, p.563-571.
27. Morales, E., Colin, I. y Avila, E. (2003). Evaluación de promotores del crecimiento para pollos de engorde. *Veterinaria. México.* 25(2), p.141-144.
28. Hopkins, M.J., Macfarlane, G.T. y Furrrie, E. (2005). A Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using realtime PCR and northern hybridisation analyses. *FEMS Microbiology Ecology.* 54 (1), p. 77-85.
29. Rosmini, M.R., Sequeira, G.J., Guerrero – Legarreta, I. Martí, L.E., Dalla – Santana, R. Frizzo, L. y Bonazza, J.C. (2004). Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Rev. Mexicana Ing. Química.* 3, p.187-197.

