



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ingeniería Agrícola
Programa de Magíster en Ingeniería Agrícola

**Evaluación Probiótica de Bacterias Lácticas Aisladas de la
Antártica como una Alternativa Sustentable para la
Producción Avícola**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ingeniería Agrícola

MICHELLE CONSTANZA FUENTES ANDANA
CHILLÁN-CHILE
2025

Profesor Guía: Dra. Apolinaria García Cancino
Dpto. de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Recursos Hídricos de la Facultad de Ingeniería Agrícola en conjunto con el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana y Departamento de Producción Animal de la Universidad de Concepción.

Profesora Guía

Dra. Apolinaria García Cancino
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesora Co-guía

Dra. Pamela Williams Salinas
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora

Ph.D. Octavio Lagos Roa
Facultad de Ingeniería Agrícola
Universidad de Concepción

Director de Programa

MSc. Pedro Melin Marín
Facultad de Ingeniería Agrícola
Universidad de Concepción

ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
RESUMEN.....	viii
SUMMARY.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	8
3. OBJETIVOS.....	8
3.1. Objetivo general.....	8
3.2. Objetivos específicos.....	8
4. METODOLOGÍA.....	9
4.1. Determinación <i>in vitro</i> : propiedades probióticas de BAL antárticas.....	9
4.1.1. Microorganismos y condiciones de cultivo.....	9
4.1.2. Dinámica de crecimiento y producción de ácido.....	10
4.1.3. Tolerancia a pH ácido y sales biliares.....	11
4.1.4. Hidrofobicidad en superficie abiótica.....	12
4.1.5. Peróxido de hidrógeno.....	13
4.1.6. Agregación salina.....	13
4.1.7. Formación de biopelículas (Biofilm).....	13
4.1.8. Actividad hemolítica.....	14
4.1.9. Gelatinasa.....	15
4.1.10. Susceptibilidad antibiótica.....	15
4.1.11. Actividad antibacteriana.....	16
4.2. Determinación <i>in vivo</i> : efecto probiótico de BAL antárticas.....	17
4.2.1. Preparación de los microorganismos antárticos para el estudio <i>in vivo</i>	17
4.2.2. Aves experimentales.....	17
4.2.3. Parámetros de producción de huevos y digestibilidad de nutrientes.....	18
4.2.4. Parámetros de calidad del huevo.....	19
4.2.5. Calidad de las heces como parámetros ambientales.....	19
4.2.6. Análisis estadístico.....	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
5.1. Capítulo I: Propiedades probióticas de Bacterias Lácticas Antárticas.....	22
5.1.1. Dinámica de crecimiento y producción de ácido.....	23

5.1.2. Propiedades fisiológicas y funcionales de BAL antárticas para su uso potencial como probióticos	26
5.1.3. Aspectos de inocuidad y seguridad de las BAL antárticas para su uso potencial como probióticos	29
5.1.4. Actividad antagonista contra patógenos	33
5.2. Capítulo II: Efecto probiótico de bacterias lácticas antárticas	35
5.2.1. Parámetros productivos	35
5.2.2. Calidad del huevo	40
5.2.3. Parámetros ambientales	42
6. CONCLUSIÓN	46
7. LITERATURA CITADA	47

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Tipos de tratamientos veterinarios aplicados en producción avícola.	2
Tabla 2. Productos naturales como alternativa frente al uso de productos sintéticos en el sector avícola.....	5
Tabla 3. Microorganismos antárticos suministrados por LABHI.....	9
Tabla 4. Descripción de la dieta basal.	18
Tabla 5. Efecto de las concentraciones de sales biliares en la viabilidad de las cepas antárticas, expresada como log ₁₀ UFC/mL.....	26
Tabla 6. Resultados de las propiedades funcionales de los microorganismos antárticos y cepa control (LP47).	29
Tabla 7. Perfil de susceptibilidad antibiótica de las bacterias lácticas antárticas y la cepa LP47 control.....	32
Tabla 8. Actividad antibacteriana de los microorganismos en estudio.....	33
Tabla 9. Efectos <i>P. pentosaceus</i> UCO-23 (T1) y <i>L. plantarum</i> UCO-54 (T2) en los parámetros productivos.	39
Tabla 10. Efectos de <i>P. pentosaceus</i> UCO-23 (T1) y <i>L. plantarum</i> UCO-54 (T2) en la calidad del huevo.....	41
Tabla 11. Efectos de <i>P. pentosaceus</i> UCO-23 (T1) y <i>L. plantarum</i> UCO-54 (T2) en los parámetros ambientales.	43
Tabla 12. Digestibilidad de Materia Seca (DMS) y Proteína Cruda (DPC).	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Producción mundial de ganado y pescado en términos de proteína.	1
Figura 2. Impacto de la producción avícola en los componentes ambientales.....	5
Figura 3. Observación microscópica de las bacterias antárticas en estudio: (A) UCO-17, (B) UCO-23, (C) UCO-29, (D) LP47 control, (E) UCO-54, (F) UCO-149B.....	22
Figura 4. Densidad de la población celular de los cultivos a diferentes horas de incubación.....	23
Figura 5. Biomasa de los cultivos microbianos a diferentes horas de incubación.	24
Figura 6. Concentración microbiana de los cultivos a diferentes horas de incubación..	24
Figura 7. Disminución de los valores de pH de los cultivos microbianos a diferentes horas de incubación.	25
Figura 8. Tolerancia de las cepas antárticas a diferentes condiciones de pH ácido (2.5, 3.0 y 3.5) durante 4 horas de incubación.....	27
Figura 9. Capacidad de adhesión en superficie abiótica (xileno) de las cepas antárticas y microorganismo control (<i>L. plantarum</i> LP47).	28
Figura 10. Efecto de <i>P. pentosaceus</i> UCO-23 (T1) y <i>L. plantarum</i> UCO-54 (T2) en la producción de huevo por semana.	36
Figura 11. Efecto de <i>P. pentosaceus</i> UCO-23 (T1) y <i>L. plantarum</i> UCO-54 (T2) en la tasa de postura por semana.	36
Figura 12. Efecto de <i>P. pentosaceus</i> UCO-23 (T1) y <i>L. plantarum</i> UCO-54 (T2) en el consumo de alimento por semana.	37
Figura 13. Efecto de <i>P. pentosaceus</i> UCO-23 (T1) y <i>L. plantarum</i> UCO-54 (T2) en la eficiencia alimenticia por semana.	37
Figura 14. Efecto de <i>P. pentosaceus</i> UCO-23 (T1) y <i>L. plantarum</i> UCO-54 (T2) en la tasa de conversión alimenticia por semana.	38

ÍNDICE DE ECUACIONES

	Página
Ecuación 1. Unidades formadoras de colonia por cada mL de cultivo.	11
Ecuación 2. Tasa de supervivencia bacteriana.....	11
Ecuación 3. Porcentaje de hidrofobicidad.	12
Ecuación 4. Cálculo de la digestibilidad aparente (DA).	19

**EVALUACIÓN PROBIÓTICA DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE
LA ANTÁRTICA COMO UNA ALTERNATIVA SUSTENTABLE PARA LA
PRODUCCIÓN AVÍCOLA**

**PROBIOTIC EVALUATION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM
ANTARCTICA AS A SUSTAINABLE ALTERNATIVE FOR POULTRY
PRODUCTION**

Palabras claves: Probióticos, bacterias ácido-lácticas, Antártica, producción avícola, sustentabilidad.

RESUMEN

El crecimiento sostenido de la producción avícola plantea tanto desafíos ambientales como de salud pública, especialmente dadas las restricciones al uso intensivo de compuestos sintéticos como los antibióticos. Al respecto, los probióticos basados en bacterias lácticas surgen como una alternativa para promover el rendimiento animal sin comprometer al medioambiente, siendo la viabilidad de las cepas uno de los principales problemas para asegurar su efecto a lo largo del ciclo productivo. En este sentido, en la Antártica se han adaptado microorganismos capaces de sobrevivir bajo condiciones climáticas extremas, convirtiéndolos en una fuente de interés investigativo debido a sus potenciales aptitudes biotecnológicas. Así, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto probiótico de bacterias lácticas antárticas como una alternativa sustentable en sistemas de producción avícola. Ocho cepas fueron caracterizadas *in vitro* en términos de su tolerancia a pH ácido y sales biliares, hidrofobicidad, formación de biopelículas,

inocuidad y su actividad antagonista frente a patógenos de interés para la industria avícola como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*. Posteriormente, dos cepas fueron seleccionadas para determinar su efecto *in vivo* en gallinas ponedoras Hy-Line W-36, distribuidas en tres grupos de tratamiento: control sin suplementación probiótica (C), *P. pentosaceus* UCO-23 (T1) y *L. plantarum* UCO-54 (T2). Como resultado, T2 mejoró significativamente ($p < 0.05$) varios parámetros productivos, tales como la tasa de postura (80.56%), eficiencia alimenticia (0.54 g huevo/g alimento), tasa de conversión alimenticia (1.94 g alimento/g huevo) y parámetros de calidad del huevo como unidades Haugh, grosor de la cáscara e índice de yema. Pese a que no se observaron diferencias significativas en variables ambientales ($p > 0.05$) como el nitrógeno total y nitrógeno amoniacal, el grupo que recibió el tratamiento con UCO-54 presentó menor concentración de materia seca en las heces, lo que podría ser un indicador de una mayor actividad fermentativa en el tracto digestivo de las aves. En conclusión, UCO-54 se perfila como una cepa probiótica prometedora para la avicultura sustentable, la cual contribuiría potencialmente a la reducción del uso intensivo de antibióticos como promotores de crecimiento, productos sintéticos y a una mayor productividad; sin embargo, pruebas adicionales son necesarias para establecer la capacidad del probiótico para mejorar parámetros ambientales.

**PROBIOTIC EVALUATION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED
FROM ANTARCTICA AS A SUSTAINABLE ALTERNATIVE FOR POULTRY
PRODUCTION**

Keywords: Probiotics, lactic acid bacteria, Antarctic, poultry, sustainability.

SUMMARY

The sustained growth of poultry production involves both environmental and public health challenges, particularly given the restrictions on the intensive use of synthetic compounds such as antibiotics. In this context, lactic acid bacteria-based probiotics have emerged as a promising alternative to enhance animal performance without compromising the environment, with strain viability being one of the main issues to ensuring their effectiveness throughout the production cycle. In this regard, microorganisms adapted to the extreme climatic conditions of Antarctica have garnered research interest due to their biotechnological potential. Therefore, this study aimed to evaluate the probiotic effect of Antarctic lactic acid bacteria as a sustainable alternative for poultry production systems. Eight strains were characterized *in vitro* based on their tolerance to acidic pH and bile salts, hydrophobicity, biofilm formation, safety, and antagonistic activity against key pathogens to the poultry industry, such as *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Staphylococcus aureus*. Subsequently, two strains were selected to determine their *in vivo* effects in Hy-Line W-36 laying hens, distributed into three treatment groups: a control group without probiotic supplementation (C), *P. pentosaceus* UCO-23 (T1), and *L. plantarum* UCO-54 (T2). As a result, T2 significantly improved ($p < 0.05$) several productive parameters, including laying rate

(80.56%), feed efficiency (0.54 g of egg/g of feed), feed conversion ratio (1.94 g of feed/g of egg), and egg quality parameters such as Haugh units, eggshell thickness, and yolk index. Although no significant differences ($p > 0.05$) were observed in environmental variables such as total nitrogen and ammoniacal nitrogen, the group supplemented with UCO-54 exhibited lower dry matter feces, which may indicate enhanced fermentative activity in the digestive tract of the hens. In conclusion, UCO-54 stands out as a promising probiotic strain for sustainable poultry production, potentially contributing to reducing reliance on antibiotics as growth promoters, minimizing synthetic additives, and greater productivity. Nevertheless, further studies are required to confirm its capacity to improve environmental parameters.

1. INTRODUCCIÓN

La expansión sostenida de la población humana ha impulsado una creciente demanda global de alimentos, caracterizada por una marcada tendencia hacia las proteínas de origen animal (Komarek *et al.*, 2021). Según proyecciones realizadas por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, por sus siglas en inglés) en conjunto con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) (2023), la carne será la proteína de mayor producción a lo largo de la próxima década (Figura 1).

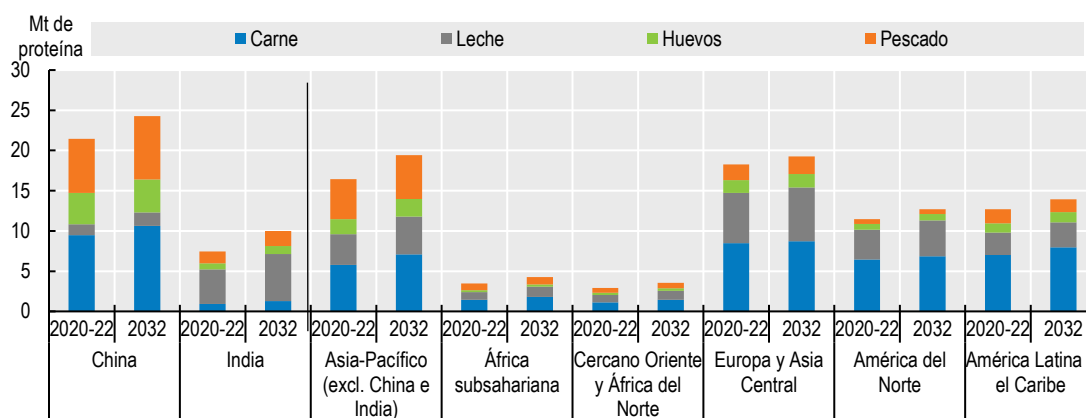


Figura 1. Producción mundial de ganado y pescado en términos de proteína. Informe sobre Perspectivas Agrícolas (OECD/FAO, 2023).

Se espera que la carne de ave represente el 43% de la proteína consumida de todas las fuentes cárnicas para el 2033 y, así también, una alta demanda de huevos. De acuerdo con la OECD (2024) este escenario favorecerá al sector avícola, cuyas ventajas en términos de ciclo productivo, mayor índice de conversión, menores costos y alimentos con contenidos de proteínas y grasas más saludables son factores que explican este pronóstico. De hecho, un anterior informe sobre *Perspectivas Agrícolas* de la OECD

(2023) destaca que las preferencias de los consumidores estarán estrechamente relacionadas con alimentos percibidos como beneficiosos para la salud y con menor impacto en el ambiente, lo que fomentará la producción de aves de corral tanto en países con altos como con bajos ingresos. En relación con esto, estadísticas recientes indican que en Chile la producción de carne de ave superó las 66 mil toneladas en enero de 2024, con un alza del 1,7% (Fuentes, 2024). Similarmente, la producción de huevos experimentó un incremento interanual del 5,4%, siendo las regiones Metropolitana, Valparaíso y Ñuble las principales contribuyentes a nivel nacional (Peñañiel, 2024).

Para satisfacer la creciente demanda de productos derivados de la avicultura, se han implementado sistemas de producción intensiva que operan en entornos controlados con condiciones óptimas de temperatura, ventilación, luz, humedad y tratamientos médicos veterinarios, los cuales permiten maximizar la productividad (Li *et al.*, 2022). No obstante, aunque el uso de productos veterinarios es fundamental para garantizar la salud de las aves, su aplicación puede generar efectos secundarios adversos tanto para los animales como para el medio ambiente (Bacanlı & Başaran, 2019; Mehdi *et al.*, 2018). Si bien son efectivos en el tratamiento y prevención de enfermedades, estos productos pueden causar consecuencias no deseadas (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de tratamientos veterinarios aplicados en producción avícola.

Productos	Ventajas	Desventajas
Antibióticos	<ul style="list-style-type: none"> - Previenen y controlan infecciones bacterianas como salmonelosis y colibacilosis¹. - Reducen la mortalidad y mejoran el rendimiento productivo al disminuir infecciones subclínicas¹. 	<ul style="list-style-type: none"> - Promueven resistencia bacteriana por uso prolongado¹. - Alteran la microbiota intestinal y afectan la digestión¹. - Contaminan el medio ambiente y pueden dejar residuos en carne y huevos¹.

Anticoccidiales	<ul style="list-style-type: none"> - Controlan la coccidiosis y previenen diarrea, desnutrición y mortalidad². - Mejoran la conversión alimenticia y el crecimiento uniforme de las aves². 	<ul style="list-style-type: none"> - Favorecen resistencia en parásitos tras uso prolongado⁴. - Pueden causar toxicidad por sobredosis⁴. - Residuos químicos contaminan el ambiente⁴.
Vacunas	<ul style="list-style-type: none"> - Previenen enfermedades como gripe aviar, Newcastle y bronquitis aviar³. - Reducen significativamente la mortalidad y prolongan la inmunidad, controlando enfermedades zoonóticas³. 	<ul style="list-style-type: none"> - Riesgo de reacciones adversas como alergias o fiebre³. - Protección incompleta si la administración es incorrecta³. - Mayor costo inicial frente a otros tratamientos³.

Elaborado a partir de Andrew Selaledi *et al.* (2020)¹, Barbour (2019)², Ganapathy and Parthiban (2024)³ y Peek and Landman (2011)⁴.

El uso indiscriminado de ciertos compuestos sintéticos, como los antibióticos, no sólo para prevenir infecciones sino también para promover el crecimiento animal, ha perturbado la magnitud del daño ambiental y la propagación de genes multirresistentes (Manyi-Loh *et al.*, 2018). En particular, los microbios resistentes, al liberarse al entorno a través de la excreta, pueden dispersarse en el ambiente adheridos a partículas de polvo y, así, recorrer largas distancias en el aire, depositándose posteriormente en el suelo o cuerpos de agua, lo que contribuye a la contaminación ambiental (Vetrova *et al.*, 2024). De esta manera, este proceso facilita la transferencia de resistencia antimicrobiana a ecosistemas acuáticos y terrestres, con implicaciones importantes para la biodiversidad y la salud pública (Lajqi Berisha *et al.*, 2024). Al respecto, la Organización Mundial de la Salud (2016) define como resistencia antimicrobiana a la capacidad que adquieren las bacterias, virus, hongos o parásitos para resistir los efectos de los medicamentos diseñados para eliminarlos o inhibir su crecimiento. De hecho, se estima que las infecciones por patógenos resistentes matan 700 mil personas al año en todo el mundo

y se espera que la cifra alcance los 10 millones para 2050 (O'Neill, 2014). En relación con esto, un estudio basado en una serie de experimentos para evaluar bacterias resistentes en la industria alimentaria descubrió que productos cárnicos elegidos en supermercados, tales como pollo y pavo, contenían niveles significativos de *Escherichia coli* multirresistente y/o potencialmente patógena (Zeitz *et al.*, 2020). Es así como esta problemática ha generado preocupación mundial debido al consumo de alimentos poco seguros, altas probabilidades de contraer infecciones difíciles de tratar, mayores tasas de mortalidad y costos asociados a la atención médica, según lo descrito por *Antimicrobial Resistance Collaborators* (2022).

Como se evidencia en la Figura 2, la intensificación de la producción avícola puede generar una serie de impactos en los componentes ambientales. Entre estos se destacan los grandes volúmenes de estiércol producidos por estos sistemas, la sobrecarga de nutrientes y proliferación de microorganismos patógenos, que alteran tanto el pH como la microbiota natural del suelo, y la emisión de olores molestos y gases nocivos que afectan la calidad del aire (Burkholder *et al.*, 2007; Gržinić *et al.*, 2023). A esto se suma que los efluentes provenientes de estos sistemas contienen altas concentraciones de nitrógeno amónico y nitrógeno nítrico, lo que promueve la eutrofización de los cuerpos de agua y, por lo tanto, la disminución de la biodiversidad acuática (Ryu *et al.*, 2018). En otras palabras, a pesar de su alta eficiencia, si los sistemas de producción avícola no son gestionados adecuadamente pueden contribuir tanto a la contaminación ambiental como a la evolución de patógenos resistentes que implican riesgos para la inocuidad alimentaria (Tiseo *et al.*, 2020).

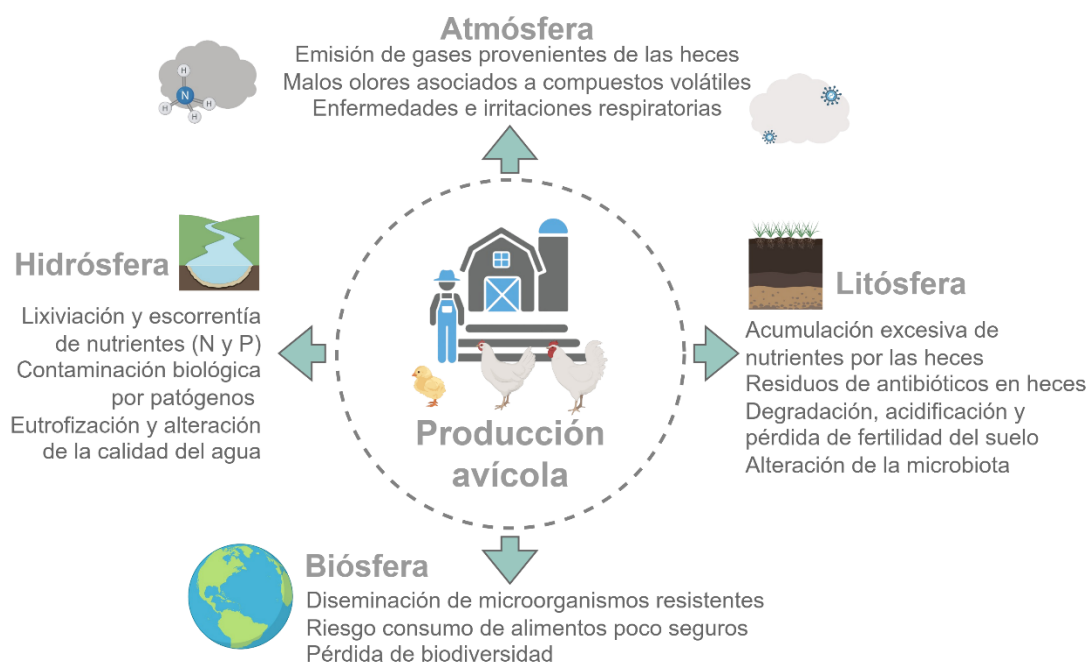


Figura 2. Impacto de la producción avícola en los componentes ambientales.

En este contexto, frente a la creciente preocupación sobre los efectos adversos del uso de productos sintéticos en la avicultura, se ha vuelto imperativo encontrar enfoques alternativos para criar animales sanos. Entre las opciones disponibles, ciertos productos naturales, como aditivos nutricionales, han ganado interés debido a su amplio espectro de impactos beneficios en la salud y el rendimiento de las aves (Gadde *et al.*, 2017). En la Tabla 2, se indican alternativas estudiadas actualmente para tales propósitos.

Tabla 2. Productos naturales como alternativa frente al uso de productos sintéticos en el sector avícola.

Tipo	Ventajas	Desventajas
Extractos de algas	<ul style="list-style-type: none"> - Mejoran la calidad del huevo y carne⁴. - Reducen colesterol y fortalecen el sistema inmune⁴. - Incrementan el rendimiento productivo⁴. 	<ul style="list-style-type: none"> - Reducción de la absorción de minerales⁴. - Posibilidad de acumulación de metales pesados⁴. - Efectos adversos en piel o sistema digestivo en altas dosis⁴.

Fitobióticos	<ul style="list-style-type: none"> - Estimulan el crecimiento y fortalecen la salud animal^{2,5}. - Ofrecen propiedades antimicrobianas y antioxidantes⁵. 	<ul style="list-style-type: none"> - Pueden inducir reacciones alérgicas o toxicidad dependiendo de la dosis y especie utilizada⁶. - Pérdida de eficacia si no se controla la calidad del extracto⁶.
Prebióticos	<ul style="list-style-type: none"> - Incrementan la absorción de nutrientes esenciales⁵. - Mejoran la microbiota intestinal y refuerzan la respuesta inmune⁵. 	<ul style="list-style-type: none"> - Efectividad dependiente de la dosis y tipo de prebiótico utilizado⁵. - Pueden fermentar en exceso en el intestino, causando molestias digestivas o diarrea⁵.
Probióticos	<ul style="list-style-type: none"> - Mejoran la digestión y fortalecen la barrera intestinal⁴. - Inhiben patógenos y promueven la respuesta inmune^{1,4}. - Incrementan la eficiencia productiva, engorde, tasa de postura y calidad del huevo^{4,5}. 	<ul style="list-style-type: none"> - Su efectividad depende de la cepa utilizada, por lo que podrían no generar ningún beneficio esperado y su uso sería innecesario⁵. - Posible necesidad de suplementación continua para mantener los efectos deseados⁵.

Elaborado a partir de Elhassan *et al.* (2021)¹, Kuralkar and Kuralkar (2021)², Michalak and Mahrose (2020)³, Jha *et al.* (2020)⁴, Ruvalcaba-Gómez *et al.* (2022)⁵ y Abdelli *et al.* (2021)⁶.

Aunque mediante extractos de plantas y algas se han obtenido resultados positivos, los probióticos destacan como una opción prometedora por su capacidad para potenciar múltiples respuestas beneficiosas en los parámetros productivos, e incluso ambientales, en aves de corral (Jha *et al.*, 2020). De acuerdo con la Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos, los probióticos son “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedero” (Hill *et al.*, 2014). Entre estos microorganismos probióticos, las bacterias ácido-lácticas (BAL) son especialmente relevantes ya que, además de ser reconocidas como seguras, forman un grupo heterogéneo de bacterias gram-positivas cuya capacidad de producir ácidos orgánicos y bacteriocinas les confiere propiedades antimicrobianas (Chen *et al.*, 2023). Adicionalmente, la adaptabilidad de las BAL a

diferentes nichos ecológicos permite su aislamiento a partir de diversas fuentes donde, dependiendo de su matriz ambiental, podrían desarrollar propiedades más tolerantes a condiciones estresantes, como aquellas que caracterizan a los climas extremos (Duar *et al.*, 2017). En este sentido, la Antártica, reconocida como el lugar más árido del mundo, alberga microorganismos capaces de sobrevivir a altos niveles de radiación ultravioleta, fuertes vientos y bajas temperaturas, entre otras condiciones estresantes, que han promovido su evolución hacia características microbiológicas resilientes (Giménez *et al.*, 2019). Sin embargo, solo se ha publicado un número limitado de estudios relacionados con bacterias lácticas antárticas y no existen publicaciones sobre sus efectos probióticos en la avicultura. En consecuencia, este estudio tiene por objetivo evaluar el efecto probiótico de BAL antárticas como una alternativa sustentable para la producción avícola. Se realizaron pruebas *in vitro* para determinar las propiedades de tolerancia, adhesión y seguridad de las bacterias, para luego seleccionar las cepas con mayor potencial probiótico y determinar su efecto *in vivo* en aves ponedoras. A partir de esta investigación, se espera que al suplementar el agua de bebida con cepas antárticas mejore el rendimiento productivo y, al mismo tiempo, los parámetros ambientales de un sistema de gallinas Hy-Line W-36. Con estos resultados se busca contribuir al desarrollo sostenible y aportar una solución innovadora con perspectiva ambiental al sector avícola.

2. HIPÓTESIS

El uso probiótico de bacterias lácticas antárticas mejora tanto los parámetros productivos como ambientales en aves de postura; por lo tanto, representa una alternativa sustentable para la producción avícola.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto probiótico de bacterias lácticas antárticas como una alternativa sustentable en la producción avícola.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar *in vitro* las propiedades probióticas de bacterias lácticas antárticas.
- Determinar *in vivo* el efecto probiótico de bacterias lácticas antárticas tanto en los parámetros productivos como ambientales de aves de postura.

4. METODOLOGÍA

4.1. Determinación *in vitro*: propiedades probióticas de BAL antárticas

4.1.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Ocho cepas de bacterias lácticas aisladas desde la Antártica e identificadas previamente mediante el ARN ribosómico 16S fueron suministradas por el Laboratorio de Biotecnología Hidroambiental (LABHI), Facultad de Ingeniería Agrícola, Universidad de Concepción (Tabla 3). Adicionalmente, la cepa *Lactiplantibacillus plantarum* LP 47 fue proporcionada como control.

Tabla 3. Microorganismos antárticos suministrados por LABHI

Género	Bacterias lácticas	
	Cepa	Aislamiento
<i>Lactiplantibacillus</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> UCO-17	Muestra ambiental de pinnípedo
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> UCO-54	Muestra de tórula anal de foca
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> UCO-179	Muestra de liquen
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecium</i> UCO-29	Muestra oral de polluelo <i>Pygoscelis adeliae</i>
	<i>Enterococcus faecium</i> UCO-38	Muestra feca de polluelo <i>Pygoscelis adeliae</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i> UCO-23	Muestra cloacal de polluelo <i>Pygoscelis papua</i>
	<i>Pediococcus pentosaceus</i> UCO-69	Muestra cloacal de polluelo <i>Pygoscelis antarcticus</i>
	<i>Pediococcus acidilactici</i> UCO-149B	Muestra de suelo

Las bacterias lácticas antárticas y cepa control, previamente congeladas a – 20 °C en un medio nutritivo (10 g/mL leche descremada, 0.5 g/100 mL extracto de levadura y 1 g/mL glucosa), se activaron por doble traspaso a 4 mL de caldo Man-Rogosa-Sharpe

(MRS) e incubaron a 37 °C (Biobase Incubator BJPX-H160) por 24 y 18 h, respectivamente. Luego, se realizó tinción de Gram para observar la morfología, agrupación y afinidad tintorial de los cultivos bacterianos, así como también para descartar aspectos de contaminación. Además, se caracterizaron las muestras mediante pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa donde se determinó la presencia o ausencia de las enzimas catalasa y Citocromo C oxidasa, respectivamente. Las propiedades probióticas de cada cepa se evaluaron *in vitro* como se describe a continuación:

4.1.2. Dinámica de crecimiento y producción de ácido

Una vez activadas las cepas, se lavaron dos veces con suero fisiológico (0.9%) para recolectar el pellet bacteriano por centrifugación (9000 rpm, 5 °C, 10 min) (Sigma 3-16KL). Las suspensiones bacterianas se ajustaron a 1×10^8 UFC/mL mediante lecturas de absorbancia a una densidad óptica de 600 nm (0.5) (Spectroquant® Prove 600). Luego, se realizaron nuevos cultivos inoculando 40 µL de cada cepa ajustada en 4 mL de caldo MRS, considerando triplicados por cada ensayo para 4 días de experimentos. A las 0, 24, 48, 72 y 96 h de incubación se midió la densidad celular de los cultivos (DO_{600nm}), y para la prueba de peso seco se utilizaron filtros de 1 micra en un sistema de filtración con una bomba de membrana (Vacuubrand® Vacuum Pump MZ2CNT) para estimar la producción de biomasa. Así también, a las 0, 48 y 96 h de incubación se hicieron diluciones seriadas en 9 mL de suero fisiológico (0.9%) y se sembraron 40 µL de cada muestra en placas de agar MRS. Tras 36 h de incubación a 37 °C, se contó el número de colonias en cada placa (BOECO Colony Counter CC-1) y se calcularon las unidades formadoras de colonias (UFC) tal como se muestra en la Ecuación 1.

Ecuación 1. Unidades formadoras de colonia por cada mL de cultivo.

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{N^{\circ} \text{ colonias} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de cultivo en mL}}$$

Por otra parte, a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de incubación se midió el pH de cada cultivo en triplicado (pH-Meter HI 2212) para interpretar la producción de ácido. Las muestras fueron caracterizadas al inicio y final del experimento mediante tinción de Gram para descartar aspectos de contaminación.

4.1.3. Tolerancia a pH ácido y sales biliares

Con algunas modificaciones, se estudió la tolerancia a condiciones ácidas según lo descrito por Anandharaj *et al.* (2015), de forma resumida cada suspensión bacteriana se inoculó en 4 mL de caldo MRS ajustado previamente a pH 2.5, 3.0 y 3.5 con ácido clorhídrico (HCl: 1 N). Los cultivos se incubaron a 37 °C y a las 0, 2 y 4 h de incubación se sembraron alícuotas de 40 µL en placas de agar MRS para determinar la tasa de supervivencia bacteriana como se indica en la siguiente ecuación:

Ecuación 2. Tasa de supervivencia bacteriana.

$$\text{Tasa de supervivencia bacteriana (\%)} = \left(\frac{\log \log UFC N_1}{\log \log UFC N_0} \right) \times 100$$

N_1 representa los grupos de tratamiento y N_0 representa el control.

De forma similar se determinó la tolerancia a sales biliares, modificando parcialmente lo descrito por Anandharaj and Sivasankari (2014) se inocularon 100 µL de cada cultivo en 10 mL de caldo MRS suplementando previamente con 0.3, 0.5 y 1% de sales biliares (Oxgall). Los cultivos se incubaron a 37 °C y se sembraron alícuotas de 100 µL a las

0, 3 y 6 h de incubación en placas de agar MRS para determinar la tasa de supervivencia como se describió anteriormente. Aquellas cepas que mantenían su recuento viable o mostraron capacidad de crecimiento en presencia de sales biliares o pH ácido se clasificaron como tolerantes.

4.1.4. Hidrofobicidad en superficie abiótica

Con algunas modificaciones, se aplicó el método de partición en solvente orgánico descrito por Rosenberg *et al.* (1983). Se cultivaron las cepas en 4 mL de caldo MRS por 24 h a 37 °C en una atmósfera con un 10% de CO₂, luego se recolectaron por centrifugación a 5000 rpm por 5 min y se suspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS). En placas de microtitulación de 96 pocillos se depositaron 1.2 mL de las suspensiones bacterianas y se realizaron lecturas de densidad ópticas definidas a DO₄₀₀=0.8–1.0 o DO₆₀₀=0.4–0.6. Posteriormente, las suspensiones se mezclaron con 300 µL de xileno, se homogenizaron en vórtex por 2 min y se dejaron reposar (10 min). Se removió la fase acuosa para realizar nuevas lecturas de densidad óptica. Siguiendo los criterios de Ocana *et al.* (1999), se calculó el porcentaje de hidrofobicidad (Ecuación 3) para clasificar las cepas con hidrofobicidad alta (%H:71–100), hidrofobicidad moderada (%H:36–70) o hidrofobicidad baja (%H:0–35).

Ecuación 3. Porcentaje de hidrofobicidad.

$$(\%H) = \left[\frac{A_0 - A}{A_0} \right] \times 100$$

A₀ y A representan los valores de densidad óptica obtenidos antes y después de mezclar la suspensión bacteriana con xileno, respectivamente.

4.1.5. Peróxido de hidrógeno

Se aplicó el método semicuantitativo descrito por Felten *et al.* (1999) para determinar la producción de H₂O₂. En resumen, las cepas se sembraron en agar MRS suplementado con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina y H₂O₂. Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C bajo un 10% de CO₂ y se interpretó el ensayo respecto a la aparición de coloración azul alrededor de las colonias. De acuerdo con la intensidad de la coloración, las cepas se clasificaron como (-) no productora de H₂O₂, (+) productora baja de H₂O₂, (++) productora regular de H₂O₂ o (+++) productora abundante de H₂O₂.

4.1.6. Agregación salina

Se aplicó el método de Ocana *et al.* (1999), sin modificaciones. Se cultivaron las cepas en caldo MRS por 48 h y se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min, luego se lavó el pellet bacteriano dos veces con PBS. Las suspensiones bacterianas se diluyeron a 10⁹ UFC/mL en PBS. Posteriormente, alícuotas de 20 µL de una solución de sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ (2M). Las muestras se dejaron reposar por 2 min y se cubrieron con cubreobjetos para observar su capacidad de agregación (o aglutinación) bajo microscopio, clasificándose como (-) no formadora de agregados, (+) formadora de agregados moderada o (++) formadora de agregados.

4.1.7. Formación de biopelículas (Biofilm)

Se utilizó el método de tinción con Cristal Violeta (CV) descrito por Salas-Jara *et al.* (2016). Después de cultivar las cepas en placas de agar MRS durante 24 h a 37 °C (10% CO₂), se prepararon suspensiones bacterianas (0.5 McFarland). En placas con fondo plano de 24 pocillos (12 mm de diámetro por pocillo) se colocaron cubreobjetos de

vidrio estériles y se depositaron 700 μL de cada suspensión bacteriana. Simultáneamente, se utilizaron placas sin cubreobjetos de vidrio para probar la superficie de poliestireno como material de soporte. Las placas se incubaron por 24 h a 37 °C (10% CO_2). Posterior a la incubación, se eliminó el medio y las células planctónicas por aspiración, y los pocillos se lavaron tres veces con PBS. Luego se secarse por 10 min a temperatura ambiente, se agregó 800 μL de CV al 0.1% p/v y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el CV no unido y los pocillos se dejaron secar 10 min. Se realizaron cuatro lavadas con PBS para eliminar el exceso de CV libre, y el colorante unido a la biopelícula se extrajo adicionando 800 μL de una mezcla de etanol/acetona (80:20). Los niveles de formación de biopelículas se estimaron midiendo la absorbancia a 590 nm, utilizando microplacas de poliestireno de 96 pocillos y un lector de microplacas proInfinite M200 (Tecan Trading AG, Männedorf, Suiza). Se calculó la formación de biopelículas para cada cepa restando el valor obtenido del control negativo (medio sin inoculación bacteriana). Cada resultado fue el promedio de tres ensayos independientes y las cepas se clasificaron como formadoras de biopelículas cuando la absorbancia resultó ≥ 2 veces mayor que el valor del control negativo.

4.1.8. Actividad hemolítica

Los microorganismos se cultivaron en agar Columbia suplementado con 5% de sangre de cordero y se incubaron a 37 °C por 24 h en condiciones microaeróbicas (10% CO_2). Siguiendo los criterios de Peres *et al.* (2014), se interpretó una β -hemólisis al observar zonas de aclaramiento alrededor de las colonias, γ -hemólisis al no observar hemólisis

(coloración) y α -hemólisis al observar una leve coloración verde alrededor de las colonias. Por lo tanto, tanto las bacterias productoras de α -hemólisis como de γ -hemólisis fueron clasificadas como no hemolíticas.

4.1.9. Gelatinasa

Siguiendo lo descrito por García-Reyes *et al.* (2023), sin modificaciones, se estudió la producción de gelatinasa. cultivando las cepas en placas de agar Brain-Heart Infusion (BHI) que contenían peptona (10 g/L) y gelatina (30 g/L). Tras su incubación a 37 °C, los cultivos se colocaron a 4 °C durante 5 h. La actividad de la gelatinasa se identificó por la capacidad de las bacterias para hidrolizar gelatina, clasificándose positiva cuando el medio de cultivo se vuelve líquido.

4.1.10. Susceptibilidad antibiótica

Se utilizó el método de difusión de discos en agar para determinar la resistencia o sensibilidad de las cepas a 20 antibióticos: amikacina (30 μ g), amoxicilina (10 μ g), ampicilina (10 μ g), ampicilina/sulbactam (20 μ g), azitromicina (15 μ g), cefuroxima (30 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), claritromicina (30 μ g), clindamicina (2 μ g), eritromicina (15 μ g), furazolidona (100 μ g), gentamicina (10 μ g), kanamicina (30 μ g), levofloxacina (5 μ g), metronidazol (5 μ g), neomicina (30 μ g), oxacilina (1 μ g), rifampicina (5 μ g), tetraciclina (30 μ g) y vancomicina (30 μ g). Previamente, se ajustaron suspensiones bacterianas a 1.5×10^8 UFC/mL (equivalente a la escala 0.5 McFarland) y se sembraron en placas de agar Müeller-Hinton utilizando tómulas estériles. Se posicionaron los discos antibióticos y las placas se incubaron por 24 h a 37 °C (10% CO₂). A continuación, los microorganismos se clasificaron como

resistentes o susceptibles a cada antimicrobiano analizando los halos de aclaramiento siguiendo los criterios de Georgieva *et al.* (2008).

4.1.11. Actividad antibacteriana

Cinco cepas patógenas de referencia fueron facilitadas por el Laboratorio de Nutrición Animal, Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (resistente a la meticilina) y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Los patógenos se cultivaron en caldo BHI a 37 °C por 24 h y se ajustaron las suspensiones bacterianas a la escala 0.5 McFarland. Posteriormente se aplicó el ensayo de difusión en pozos de agar, realizando perforaciones de 5 mm de diámetro en placas de agar Müeller-Hinton. Los patógenos se sembraron utilizando tómulas estériles y 100 µL de cada bacteria láctica (previamente cultivadas por 24 h a 37 °C en caldo MRS) se depositaron en su respectivo pocillo. Se utilizó caldo MRS como control negativo. Las placas se incubaron por 48 h a 37 °C para determinar la aparición de halos de inhibición. Siguiendo los criterios de Baccigalupi *et al.* (2005), la actividad antibacteriana se clasificó como: 0 a 1 mm inhibición nula (+/-), 2 mm inhibición moderada (+), 2 a 5 mm inhibición alta (++) y más de 5 mm inhibición muy alta (+++).

4.2. Determinación *in vivo*: efecto probiótico de BAL antárticas

4.2.1. Preparación de los microorganismos antárticos para el estudio *in vivo*

A partir de los resultados *in vitro*, se seleccionaron las cepas *P. pentosaceus* UCO-23 y *L. plantarum* UCO-54 para evaluar su efecto probiótico en gallinas de postura. Con algunas modificaciones, se aplicó el método descrito por Mappleby *et al.* (2013). Se realizaron cultivos independientes de cada cepa activada en 500 mL de caldo MRS y se incubaron por 24 h a 37°C. Se recolectó el pellet bacteriano por centrifugación (9000 rpm, 5 °C, 10 min) y se resuspendió en 100 mL de agua destilada estéril, respectivamente. Adicionalmente, se demostró que las bacterias se mantuvieron viables en agua potabilizada sin decrecimiento significativo por aproximadamente 3 h ($\pm 7.0 \times 10^6$ UFC/mL UCO-23; $\pm 6.3 \times 10^6$ UFC/ml UCO-54).

4.2.2. Aves experimentales

Un total de 108 gallinas de postura de la línea genética Hy-Line W-36 (100 semanas de edad; peso corporal promedio de 1.59 kg) fueron facilitadas por la Estación Experimental “Marcelo Tima Péndola” (Fundo El Alazán, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción) ubicada a 25 km al nororiente de Chillán, sector Quinquihua, región de Ñuble. Se trabajó en un galpón cerrado y aislado, provisto de luz artificial (16 h de luz y 8 h de oscuridad) y ventilación, adaptándose una batería de postura tradicional en disposición vertical. Las aves se asignaron aleatoriamente en 3 grupos de tratamiento, compuestos por 6 subgrupos (repeticiones) que contenían 6 gallinas cada uno, dispuestas en un sistema de jaulas (66 cm frente, 48.5 cm fondo, 37 mm altura, área total 0.32 m²). Una cinta continua bajo las jaulas se utilizó para retirar

las excretas. La dieta basal de las aves se describe en la Tabla 4, siendo la ración diaria recomendada igual a 110 g/ave/día, acorde con las indicaciones establecidas para la línea genética, y se ofreció agua *ad libitum* durante todo el estudio. El manejo de las aves se ajustó a las directrices del Comité de Bioética y Bienestar Animal de la Universidad de Concepción, protocolos de la Guía de Buenas Prácticas sobre Bienestar Animal en los Sistemas de Producción de Huevo del SAG (2018) y protocolos de Bioseguridad establecidos en los Manuales de Procedimientos BIOSAV/MP3 y BIOSAV/MP7 del SAG (2016).

Tabla 4. Descripción de la dieta basal.

Ingredientes	Cantidad (g/100 g)	Contenido nutricional	%
Maíz	74.8	Materia seca	89.7
Soya	18.8	Cenizas totales	17.1
Conchuela	9.9	Proteína cruda	19.5
Harina de pescado	4.4	Fibra cruda	2.0
Fosfato bicálcico	1.5	Extracto etéreo	3.3
Sal	0.2	Extractos	47.8
Minerales	0.1	no nitrogenados	
Vitaminas	0.2	Energía	2.1
Metionina	0.1	metabolizable	

4.2.3. Parámetros de producción de huevos y digestibilidad de nutrientes

Se registró diariamente la producción de huevos y el consumo de alimento considerando un total de 2 kg de alimento suministrados por jaula. A partir de esto, se calculó el consumo de alimento diario, la producción diaria de huevos (%), eficiencia alimenticia [$\% = (\text{producción de huevos (kg)} / \text{consumo de alimento (kg)}) \times 100$] e índice de conversión de alimento [$\text{consumo de alimento (kg)} / \text{producción de huevos (kg)}$]. Se utilizó el método del indicador de ceniza insoluble en ácido para determinar la digestibilidad (Ecuación 4), donde el análisis de la calidad de las heces (sección 4.2.5.)

permitió estimar la cantidad de materia seca (MS), materia orgánica (MO), cenizas totales (CT), cenizas insolubles en ácido (CIA) y proteína cruda (PC) contenida en las muestras.

Ecuación 4. Cálculo de la digestibilidad aparente (DA).

$$DA = 100 \times \frac{[1 - \frac{(CIA \text{ en alimento})}{(CIA \text{ en heces})} \times (Concentración \text{ nutriente en heces})]}{(Concentración \text{ nutriente en alimento})}$$

Donde,

CIA en el alimento: cantidad de ceniza insoluble en ácido en el alimento;

CIA en las heces: cantidad de ceniza insoluble en ácido en las heces.

Concentración nutriente en heces: concentración del nutriente de interés en las heces.

4.2.4. Parámetros de calidad del huevo

Al final del periodo experimental (día 42) se seleccionaron aleatoriamente 3 huevos por jaula (18 huevos por tratamiento) con el fin de determinar el peso del huevo, altura de albúmina, color de yema, unidades Haugh, fuerza de ruptura de la cáscara, grosor de la cáscara e índice de yema. Estas mediciones fueron evaluadas mediante un medidor digital de huevo (equipo DET6500, Nabel, Japón).

4.2.5. Calidad de las heces como parámetros ambientales

Se evaluaron algunos parámetros ambientales asociados a la generación de gases de efecto invernadero, contaminación del aire y de cuerpos de agua. De cada unidad experimental se recolectaron muestras de heces durante los días 40, 41 y 42 de estudio, las cuales se guardaron por separado en bolsas de polietileno con cierre hermético, se transportaron en frío y refrigeraron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. A continuación, se

describe como se analizó la calidad de las heces respecto a la humedad, medida gravimétricamente al determinar la materia seca (MS) por liofilización, nitrógeno total (NT) y nitrógeno amoniacal (N-NH₃), así como también los parámetros que fueron de utilidad para estimar la digestibilidad indicada en la sección 4.2.3. De forma breve, basándose en Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (1997), la MS se determinó mediante gravimetría utilizando la desecación de las muestras a 105 °C hasta alcanzar peso constante, mientras que la MO y CT se estimaron por gravimetría incinerando las muestras a 550 °C hasta la obtención de un residuo inorgánico (la diferencia de peso antes y después de la incineración corresponde a la materia orgánica de la muestra, y el residuo obtenido representa las cenizas totales). Para la CIA se incineraron las muestras, las cenizas se lavaron con agua destilada para luego filtrar la solución reteniendo las cenizas insolubles y la diferencia de peso antes y después del lavado permitió su determinación. Se calculó el NT utilizando el método de destilación de Kjeldahl, por digestión de la muestra en ácido sulfúrico concentrado, seguida de la destilación y titulación del amoníaco liberado. Por otra parte, se determinó el N-NH₃ separando el sobrenadante de las muestras congeladas (1.400 g, 20 min) para aclarar el extracto y se realizó una dilución 1:40 mezclando 0.25 mL de sobrenadante con 9.75 mL de agua destilada. A continuación, se tomaron 100 µL de la dilución y se añadieron 4 mL de fenol y 4 mL de hipoclorito de sodio, generando un compuesto de color azul al cual se midió su absorbancia (625 nm) utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Spectroquant® Pharo 400). Finalmente, la PC digerida se estimó como el coeficiente de digestibilidad por el consumo de proteína.

4.2.6. Análisis estadístico

Similar a Mörschbacher *et al.* (2023), todos los ensayos se realizaron por triplicado y se presentaron los resultados como media y error estándar de la media (EEM) cuyo análisis estadístico se realizó en el software estadístico jamovi (versión 2.3.28). En primera instancia, los datos se sometieron a una prueba de normalidad (Shapiro-Wilks). A continuación, aquellos datos que siguieron una distribución normal se sometieron a un ANOVA de una vía con medias comparadas mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). De lo contrario, aquellos datos que siguieron una distribución no paramétrica se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida del post-hoc de Dunn-Bonferroni ($p < 0.05$).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Capítulo I: Propiedades probióticas de Bacterias Lácticas Antárticas

Se estudiaron las características bioquímicas de ocho microorganismos antárticos y una cepa control, los cuales fueron clasificados como catalasa y oxidasa negativa. En relación con esto, la ausencia de las enzimas catalasa y Citocromo C oxidasa implica que las bacterias sean más susceptibles a condiciones oxidativas; por ello, ambientes anaeróbicos o microaeróbicos potenciarían preferentemente su desarrollo (Chen, 2019). Por otra parte, se determinó su afinidad tintorial como Gram-positivas, destacando la morfología bacilar con extremos cortos redondeados en las cepas *L. plantarum* (UCO-17, UCO-54 y LP47), y diplococos en el caso de *E. faecium* UCO-29, *P. pentosaceus* UCO-23 y *P. acidilactici* UCO-149B (Figura 2).

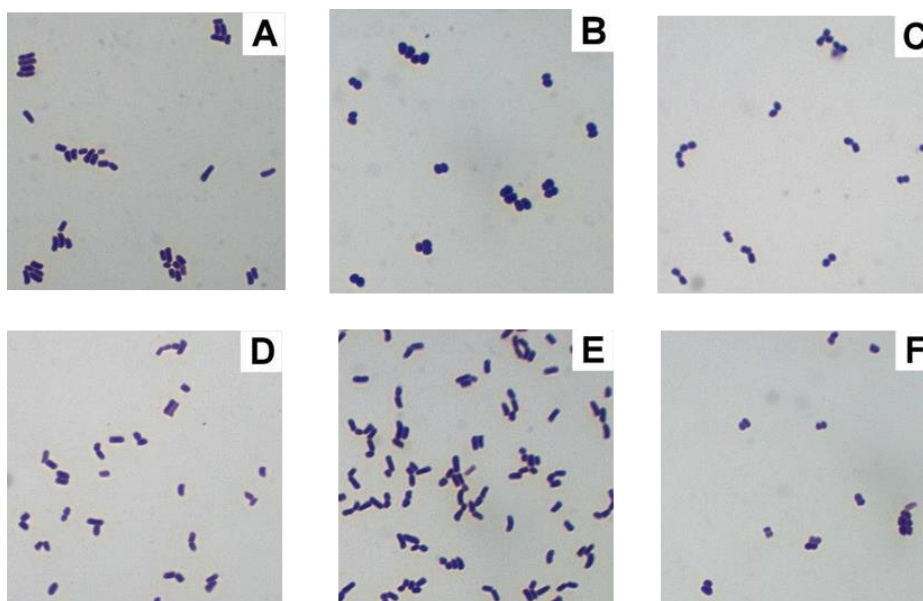


Figura 3. Observación microscópica de las bacterias antárticas en estudio: (A) UCO-17, (B) UCO-23, (C) UCO-29, (D) LP47 control, (E) UCO-54, (F) UCO-149B.

Los siguientes microorganismos fueron descartados para evaluar su aptitud probiótica debido a la presencia de dos tipos de morfología: *E. faecium* UCO-38, *P. pentosaceus* UCO-69 y *L. plantarum* UCO-179B. Lo anterior, podría estar relacionado con aspectos de contaminación de las muestras durante su almacenamiento y/o manipulación en laboratorio; por lo tanto, se sugiere un re-aislamiento de las bacterias y una nueva secuenciación de su ARNr 16S.

5.1.1. Dinámica de crecimiento y producción de ácido

Los resultados de la cinética de crecimiento permiten comprender mejor las condiciones óptimas del desarrollo de un microorganismo (Jannasch & Egli, 1993). En este estudio, las bacterias evaluadas mostraron una alta actividad microbiana durante las primeras 24 a 48 h de incubación (Figura 4, 5 y 6).

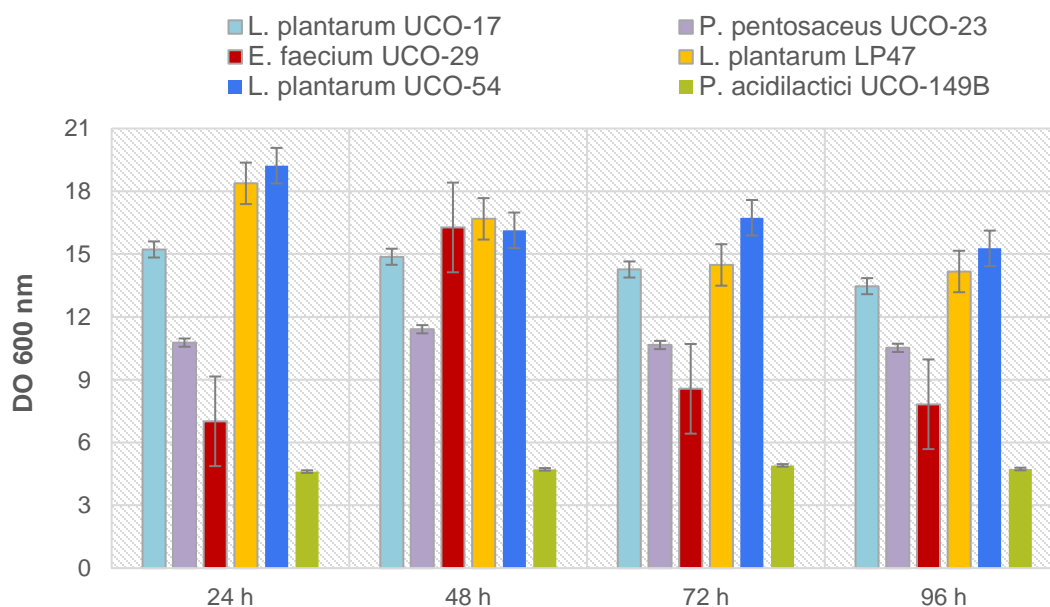


Figura 4. Densidad de la población celular de los cultivos a diferentes horas de incubación.

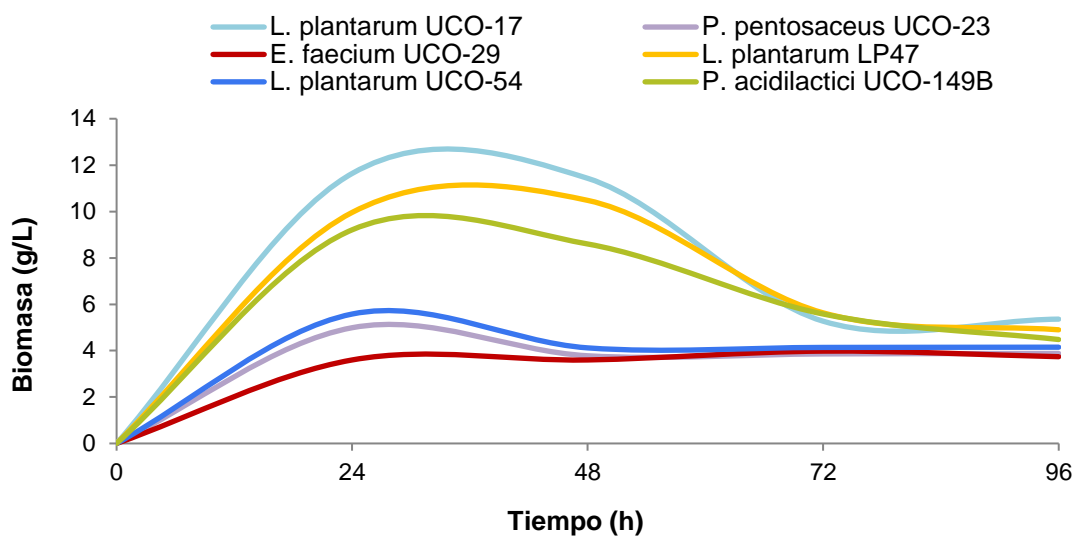


Figura 5. Biomasa de los cultivos microbianos a diferentes horas de incubación.

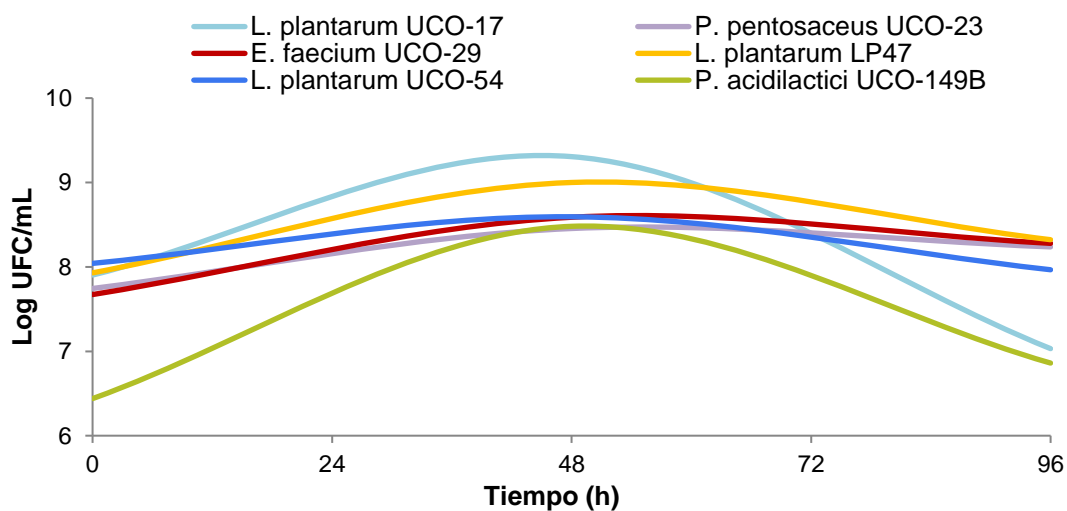


Figura 6. Concentración microbiana de los cultivos a diferentes horas de incubación.

A diferencia de *P. acidilactici* UCO-149B, que de acuerdo con las lecturas de absorbancia obtuvo una densidad superior de células posterior a las 24 h de incubación, los demás microorganismos crecieron exponencialmente hasta alcanzar su fase estacionaria alrededor de las 72 h. Resultados similares se obtuvieron en las pruebas de

peso seco y conteo bacteriano, donde la cepa UCO-17 destacó por lograr la más alta cantidad de biomasa y concentración microbiana igual a 11.6 g/L y log 9.3 UFC/mL en un trascurso de 48 h de incubación, respectivamente. Por otra parte, se evidenció una disminución significativa en los niveles de pH de los cultivos microbianos a lo largo del tiempo (Figura 7). Esta acidificación progresiva del medio es un fenómeno característico de las bacterias lácticas y se atribuye a la producción de ácido láctico como producto de la fermentación durante su metabolismo (Ribeiro *et al.*, 2021).

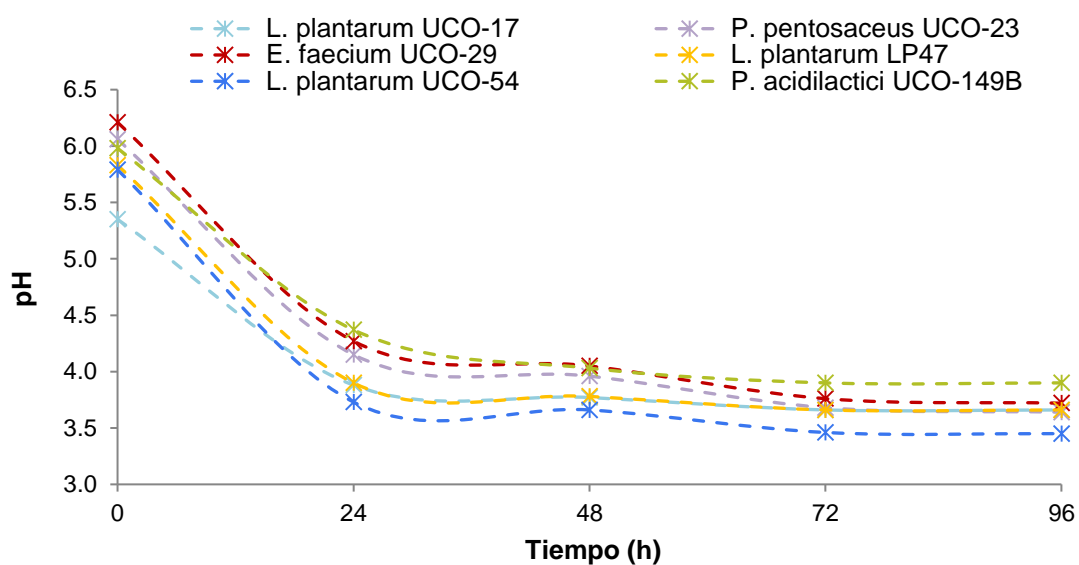


Figura 7. Disminución de los valores de pH de los cultivos microbianos a diferentes horas de incubación.

Considerando los resultados de la dinámica de crecimiento, se determinó que tanto las bacterias antárticas en estudio como la cepa control LP47 alcanzan su mayor actividad microbiana durante las primeras 24 a 48 h de crecimiento, donde podrían convertir los carbohidratos presentes en el medio de cultivo en ácido láctico y producir otros metabolitos bioactivos de interés (ácidos orgánicos, bacteriocinas, aminoácidos,

vitaminas, entre otros) (Tang *et al.*, 2023), razón por la cual deberían recolectarse durante este periodo.

5.1.2. Propiedades fisiológicas y funcionales de BAL antárticas para su uso potencial como probióticos

Una cepa probiótica debe demostrar capacidad de tolerar condiciones gastrointestinales adversas, tales como bajos niveles de pH y la presencia de bilis en el intestino delgado, para ejercer eficazmente su función beneficiosa (Argyri *et al.*, 2013). Las propiedades fisiológicas de las bacterias lácticas antárticas para tolerar sales biliares y condiciones ácidas se muestran en la Tabla 5 y Figura 8, respectivamente.

Tabla 5. Efecto de las concentraciones de sales biliares en la viabilidad de las cepas antárticas, expresada como \log_{10} UFC/mL.

Cepa	0 h			3 h			6 h		
	Concentración de sales biliares (%)								
	0.3	0.5	1	0.3	0.5	1	0.3	0.5	1
UCO-17	7.6	7.6	7.6	7.3	7.2	7.2	7.9	7.8	7.9
UCO-23	7.0	6.7	6.7	7.4	7.5	7.4	7.9	8.0	7.6
UCO-29	6.9	6.9	6.7	7.3	8.1	7.8	8.2	8.0	7.9
LP47	7.7	8.1	7.7	7.2	6.7	7.2	7.8	7.7	7.8
UCO-54	8.0	7.8	7.8	7.0	7.5	7.4	7.8	7.9	7.9
UCO-149B	7.3	7.4	7.0	6.0	7.7	7.0	7.6	8.0	7.8

Tanto las cepas antárticas como el microorganismo control crecieron en presencia de sales biliares a lo largo del tiempo. En relación con estos resultados, algunos de los mecanismos asociados a este tipo de tolerancia incluyen la barrera de la pared celular, la presencia de bombas de eflujo y la acción de la enzima BSH (hidrolasa de sales biliares) la cual se encarga de romper los enlaces en las sales biliares,

descomponiéndolos en productos más simples y menos perjudiciales para la supervivencia bacteriana (Bustos *et al.*, 2018; Ruiz *et al.*, 2013).

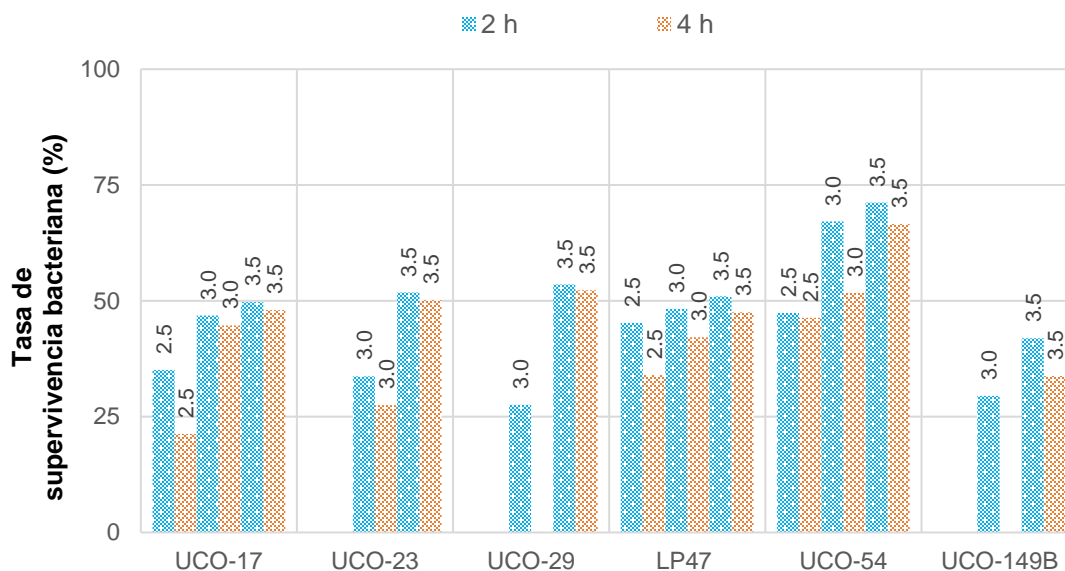


Figura 8. Tolerancia de las cepas antárticas a diferentes condiciones de pH ácido (2.5, 3.0 y 3.5) durante 4 horas de incubación.

A pesar de que tanto *E. faecium* UCO-29 como *P. acidilactici* UCO-149 perdieron viabilidad luego de 4 h, todas las cepas fueron capaces de tolerar pH 3.0 y 3.5 al menos por 2 h. Sin embargo, únicamente cepas derivadas de lactobacilos (UCO-17, UCO-54, LP47) mostraron aptitud de resistir pH 2.5, especialmente *L. plantarum* UCO-54 que obtuvo una tasa de supervivencia igual a 46.3% luego de 4 h de incubación. Estudios similares han demostrado la resistencia de diferentes cepas de *L. plantarum*, *E. faecium* y *Pediococcus spp.* a condiciones ácidas para su potencial aplicación en producción avícola, lo que podría atribuirse a una característica recurrente en este tipo de especie de bacteria láctica (Dixon *et al.*, 2022; He *et al.*, 2021; Shi *et al.*, 2020).

Por otra parte, en la Figura 9 y Tabla 6 se muestran los resultados sobre las propiedades funcionales de los microorganismos. Únicamente *L. plantarum* UCO-54 demostró una alta hidrofobicidad en superficie abiótica (85.1%), mientras que *P. acidilactici* UCO-149B y *P. pentosaceus* UCO-23 mostraron hidrofobicidad moderada en presencia de xileno (37.4% y 35.1%, respectivamente). Se destaca que para que un probiótico genere beneficios en la salud del huésped, como inhibir el asentamiento de patógenos mediante secreciones con potencial antibacteriano, es necesario que pueda adherirse y colonizar la superficie del intestino (Juturu & Wu, 2018). Precisamente, las interacciones hidrofóbicas son interacciones no covalentes fuertes de largo alcance que pueden ofrecer una ventaja competitiva en la capacidad de adhesión de ciertas bacterias lácticas (Ehrmann *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2017). De todas formas, algunas pruebas adicionales deberían considerarse para determinar de forma holística las propiedades de adhesión de estos microorganismos, ya que existen otros factores que pueden intervenir en esta característica (García-Cayuela *et al.*, 2014).

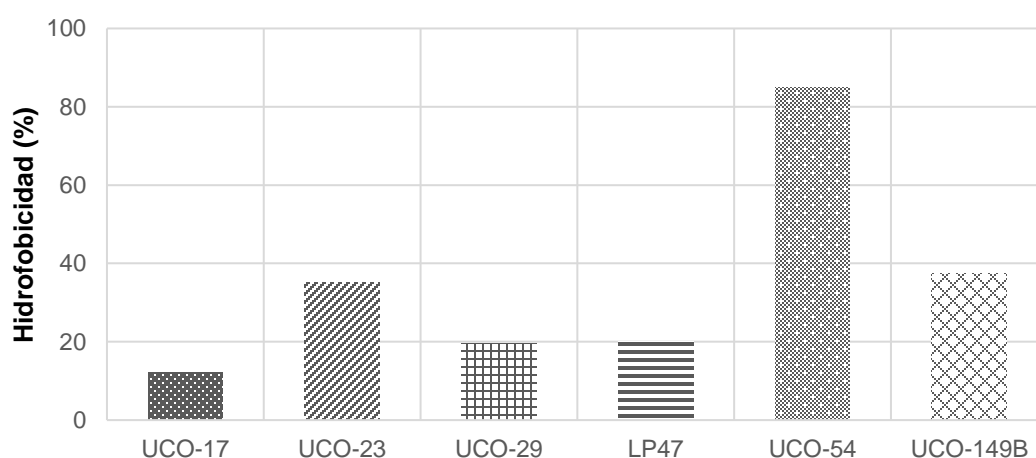


Figura 9. Capacidad de adhesión en superficie abiótica (xileno) de las cepas antárticas y microorganismo control (*L. plantarum* LP47).

Tabla 6. Resultados de las propiedades funcionales de los microorganismos antárticos y cepa control (LP47).

Microorganismo	Propiedad		
	Producción de H ₂ O ₂	Agregación salina	Formación de biofilm
<i>L. plantarum</i> UCO-17	+	++	+
<i>P. pentosaceus</i> UCO-23	-	++	+
<i>E. faecium</i> UCO-29	+	-	+
<i>L. plantarum</i> LP47	-	-	+
<i>L. plantarum</i> UCO-54	+	+	+
<i>P. acidilactici</i> UCO-149B	++	+	+

Se determinó que la producción de peróxido de hidrógeno fue positiva en las cepas UCO-17, UCO-29, UCO-54 y UCO-149B. Otros estudios han detectado esta capacidad en *Lactobacillus spp.*, la cual puede ser beneficiosa en términos de adaptación al entorno intestinal ya que el H₂O₂ tiene propiedades antibacterianas que permitirían reducir el crecimiento de bacterias patógenas (Hertzberger *et al.*, 2014). Así también, las cepas UCO-17, UCO-23, UCO-54 y UCO-149B demostraron una agregación salina positiva, cuya habilidad de aglutinación podría indicar una mayor capacidad de adherencia celular (García *et al.*, 2017). Todos los microorganismos se clasificaron como formadores de biopelículas (biofilm), una propiedad interesante para cepas probióticas que promueve una mayor permanencia de las bacterias lácticas en la mucosa intestinal (Terraf *et al.*, 2012).

5.1.3. Aspectos de inocuidad y seguridad de las BAL antárticas para su uso potencial como probióticos

Además de poseer aptitudes funcionales óptimas, los probióticos deben ser inocuos y seguros para su consumo. En esta investigación se realizaron pruebas de actividad hemolítica, gelatinasa y susceptibilidad antimicrobiana para comprobar estos aspectos.

Mediante las pruebas de actividad hemolítica, se determinó que las cepas UCO-23, UCO-29, LP47 y UCO-54 exhiben γ -hemólisis, lo que sugiere su capacidad de crecer en la sangre sin comprometer la integridad de los glóbulos rojos. A diferencia de cepas como *Staphylococcus pyogenes* identificadas como β -hemolíticas, *L. plantarum* UCO-17 y *P. acidilactici* UCO-149B mostraron α -hemólisis. Siguiendo los criterios de Peres *et al.* (2014) y los resultados de la prueba de degradación de la gelatina, las bacterias antárticas se clasificaron como no hemolíticas y gelatinasa negativa, por lo que son inocuas para su aplicación probiótica. Resultados similares se han obtenido en la caracterización de las cepas probióticas *Lactiplantibacillus plantarum* BI-59.1 y *Lactobacillus fermentum* UCO-979C (García-Reyes *et al.*, 2023; García *et al.*, 2017). Por otra parte, es importante considerar la contribución de los sistemas intensivos de producción animal en la propagación de bacterias multirresistentes a los antibióticos; por lo tanto, una cepa probiótica debe ser sensible a la mayoría de antimicrobianos con el fin de evitar la introducción de genes de resistencia en este tipo de sistemas (Zhou *et al.*, 2020). En la Tabla 7 se muestra la susceptibilidad o resistencia de los microorganismos antárticos a diferentes discos de antibióticos. De acuerdo con los resultados obtenidos, todas las bacterias mostraron resistencia a la vancomicina y metronidazol, y en algunos casos a la furazolidona, kanamicina, ciprofloxacina y oxacilina. Tanto *P. pentosaceus* UCO-23 como *L. plantarum* UCO-54 fueron susceptibles a 16 de los 20 antibióticos evaluados. Por el contrario, *E. faecium* UCO-29 presentó resistencia al 35%, incluida la cefuroxima, lo cual podría no ser apropiado para su aplicación probiótica *in vivo*. Sin embargo, estas pruebas fenotípicas no pueden

confirmar la presencia o ausencia de genes de resistencia transferibles, por lo que otros métodos deberían aplicarse para complementar esta información preliminar.

Investigaciones previas han identificado patrones similares de resistencia a glicopéptidos, aminoglucósidos, cefalosporinas e inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos en cepas de *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilactici* aisladas de fuentes diversas (Anisimova & Yarullina, 2019; Ly *et al.*, 2022; Pruthviraj *et al.*, 2023; Rojo-Bezares *et al.*, 2006; Rozos *et al.*, 2018; Singla *et al.*, 2018). Sin embargo, es importante considerar que estos mecanismos de resistencia suelen ser intrínsecos en ciertas especies de lactobacilos y pediococos, debido principalmente a características estructurales y funcionales inherentes que fomentan la supervivencia bacteriana; por lo tanto, no se propagarían por transferencia horizontal de genes (Abriouel *et al.*, 2015; Stefańska *et al.*, 2021).

De acuerdo con los resultados de susceptibilidad antibiótica, tanto las bacterias lácticas antárticas en estudio como la cepa control *L. plantarum* LP47 se consideran seguras para su aplicación probiótica en la avicultura, donde es recurrente el uso de betalactámicos (Mund *et al.*, 2016). Aun así, se sugiere realizar estudios complementarios para desestimar la presencia de genes de resistencia codificados en plásmidos, especialmente considerando la incidencia de ciertos enterococos resistentes a la vancomicina (Im *et al.*, 2023).

Tabla 7. Perfil de susceptibilidad antibiótica de las bacterias lácticas antárticas y la cepa LP47 control.

Antibiótico	Microorganismo					
	<i>L. plantarum</i> UCO-17	<i>P. pentosaceus</i> UCO-23	<i>E. faecium</i> UCO-29	<i>L. plantarum</i> LP47	<i>L. plantarum</i> UCO-54	<i>P. acidilactici</i> UCO-149B
Amikacina	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Amoxicilina	SS	SS	S	SS	SS	S
Ampicilina	SS	SS	S	SS	SS	S
Ampicilina/ Sulbactam	SS	SS	S	SS	SS	S
Azitromicina	SS	S	S	SS	SS	S
Cefuroxima	SS	SS	R	SS	SS	S
Ciprofloxacina	R	S	R	R	MS	R
Claritromicina	SS	S	SS	SS	SS	SS
Clindamicina	S	SS	SS	S	S	SS
Eritromicina	SS	SS	SS	SS	SS	SS
Furazolidona	R	R	R	R	R	MS
Gentamicina	S	MS	MS	MS	MS	MS
Kanamicina	R	MS	R	R	R	R
Levofloxacina	MS	S	MS	MS	MS	MS
Metronidazol	R	R	R	R	R	R
Neomicina	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Oxacilina	MS	R	R	MS	MS	R
Rifampicina	S	MS	S	S	S	SS
Tetraciclina	SS	SS	S	SS	SS	SS
Vancomicina	R	R	R	R	R	R

Nota: SS, altamente susceptible; S, susceptible; MS, moderadamente susceptible; R, resistente.

5.1.4. Actividad antagonista contra patógenos

Evaluar la capacidad inhibitoria de indicadores patógenos es esencial para seleccionar probióticos capaces de reducir la contaminación biológica causada por bacterias asociadas con enfermedades severas o resistentes a los antimicrobianos (Leska *et al.*, 2022). En la Tabla 8 se presentan los resultados de antagonismo de las BAL antárticas frente a patógenos de referencia de especies de interés para la industria avícola.

Tabla 8. Actividad antibacteriana de los microorganismos en estudio.

Cepas BAL	Cepas patógenas				
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. enterica</i> ATCC 13076	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
<i>L. plantarum</i> UCO-17	+++	+++	+++	+++	±
<i>P. pentosaceus</i> UCO-23	+++	+++	+++	+++	±
<i>E. faecium</i> UCO-29	+++	+++	+++	+++	±
<i>L. plantarum</i> LP47	+++	+++	+++	+++	±
<i>L. plantarum</i> UCO-54	+++	+++	+++	+++	±
<i>P. acidilactici</i> UCO-149B	+++	+++	+++	+++	±

Nota: Zonas de inhibición clasificadas como 0 – 1 mm: ± (no inhibición); 2 mm: + (moderada); 2 – 5 mm: ++ (alta); > 5 mm: +++ (muy alta), respectivamente.

Incluyendo a la cepa control *L. plantarum* LP47, todos los microorganismos antárticos mostraron una alta actividad antibacteriana alcanzando zonas con diámetros de inhibición ≥ 15 mm, en promedio. Esto es excluyente a los resultados obtenidos frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, ya que las bacterias lácticas fueron incapaces de exhibir antagonismo contra esta cepa. En relación con esto, un estudio evidenció que

la actividad inhibitoria de *Lactobacillus plantarum* VJC38 era menor contra BAL, sugiriendo que el potencial antimicrobiano se relaciona con la producción de ácido (Nallala & Jeevaratnam, 2018). Específicamente, las bacterias lácticas generan una serie de metabolitos tales como ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, péptidos antimicrobianos y/o peróxido de hidrógeno, cuyas propiedades bactericidas o bacteriostáticas permiten reducir el crecimiento intestinal de microorganismos patógenos (Özcelik *et al.*, 2016; Vieco-Saiz *et al.*, 2019).

Diferentes estudios han comprobado el antagonismo de las BAL contra patógenos recurrentes en la avicultura como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.*, indicando que esta aptitud puede relacionarse con aspectos cepa-específicos (Dixon *et al.*, 2022; Karimi *et al.*, 2018; Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2021). En esta investigación, las BAL antárticas exhibieron mayor rango de inhibición contra *E. coli* ATCC 25922 (15–20 mm). Además, los lactobacilos mostraron capacidad antibacteriana de interés ya que las cepas con mayores radios de inhibición contra *S. enterica* ATCC 13076 fueron *L. plantarum* UCO-17 y LP47 (16 mm), mientras que *L. plantarum* UCO-54 y UCO-17 contra *S. aureus* ATCC 25923 (18 mm) y *S. aureus* ATCC 43300 resistente a la meticilina (19 mm), respectivamente. Estos hallazgos son similares con los de Asha (2012), que detectó cepas de *Lactobacillus spp.* con actividad inhibitoria de 12.5 a 18 mm contra *S. enteritidis*, *S. typhimurium* y tres serotipos de *E. coli*. Debido al potencial antagonista de las BAL antárticas contra microorganismos infecciosos y enteropatógenos, se espera que su uso probiótico tenga efectos beneficiosos en la salud de las aves de corral.

5.2. Capítulo II: Efecto probiótico de bacterias lácticas antárticas

El uso de probióticos como aditivos funcionales puede contribuir positivamente a la industria avícola, promoviendo la salud intestinal, los parámetros productivos y/o la calidad de compuestos específicos en el estiércol (Deng *et al.*, 2022; Qiao *et al.*, 2019). Por lo anterior, se evaluó el efecto probiótico de dos cepas antárticas, seleccionadas por presentar propiedades probióticas sobresalientes, sobre los parámetros productivos y ambientales de gallinas Hy-Line W-36. Los tratamientos analizados consideraron un control sin probiótico (C), suplementación con *Pediococcus pentosaceus* UCO-23 (T1) y suplementación con *Lactiplantibacillus plantarum* UCO-54 (T2). Cabe señalar que, a lo largo del ensayo *in vivo*, las gallinas ponedoras se mantuvieron sanas y la mortalidad observada fue mínima, con solo dos aves fallecidas en el tratamiento probiótico T2; sin embargo, esto ocurrió durante la fase de reordenamiento de las aves previo al período de adaptación, siendo una muerte natural sin causa patológica, relacionada más bien con factores de competencia social dentro de la jaula, como disputas jerárquicas o estrés por dominancia entre el grupo (Carvalho *et al.*, 2018), por lo que fueron reemplazadas al iniciar el estudio. En general, se considera que una supervivencia igual o superior al 95% es un buen indicador de la salud y manejo adecuado en aves de postura (Kumar & Bhattacharya, 2019).

5.2.1. Parámetros productivos

El efecto probiótico de las cepas UCO-23 y UCO-54 en gallinas ponedoras Hy-Line W-36 consideró su evaluación en múltiples parámetros de interés para la producción avícola. Al respecto, la evolución en la producción de huevos, porcentaje de postura,

consumo de alimento, eficiencia alimenticia y tasa de conversión alimenticia a lo largo de los 42 días de estudio, se muestra en las Figuras 10–14.

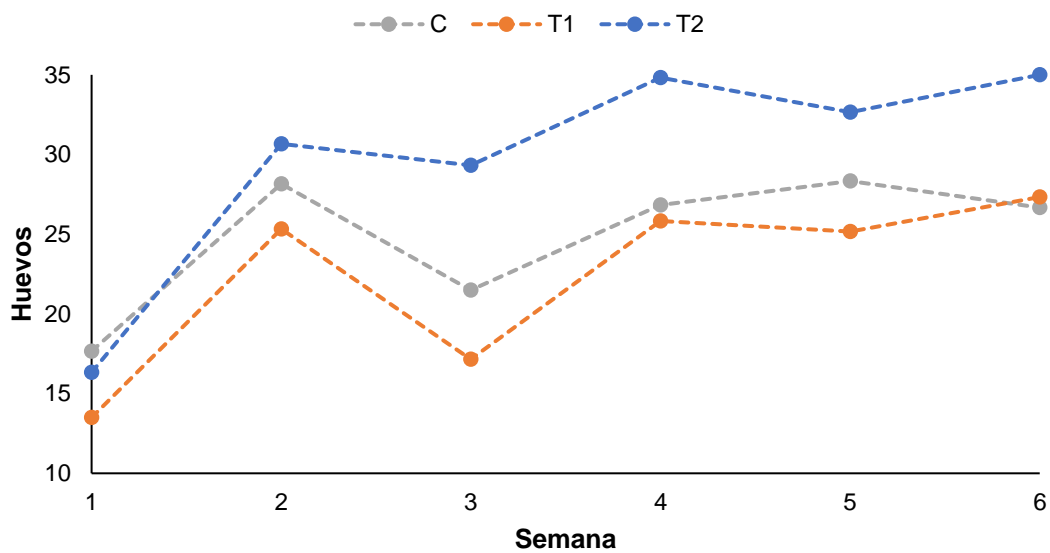


Figura 10. Efecto de *P. pentosaceus* UCO-23 (T1) y *L. plantarum* UCO-54 (T2) en la producción de huevo por semana.

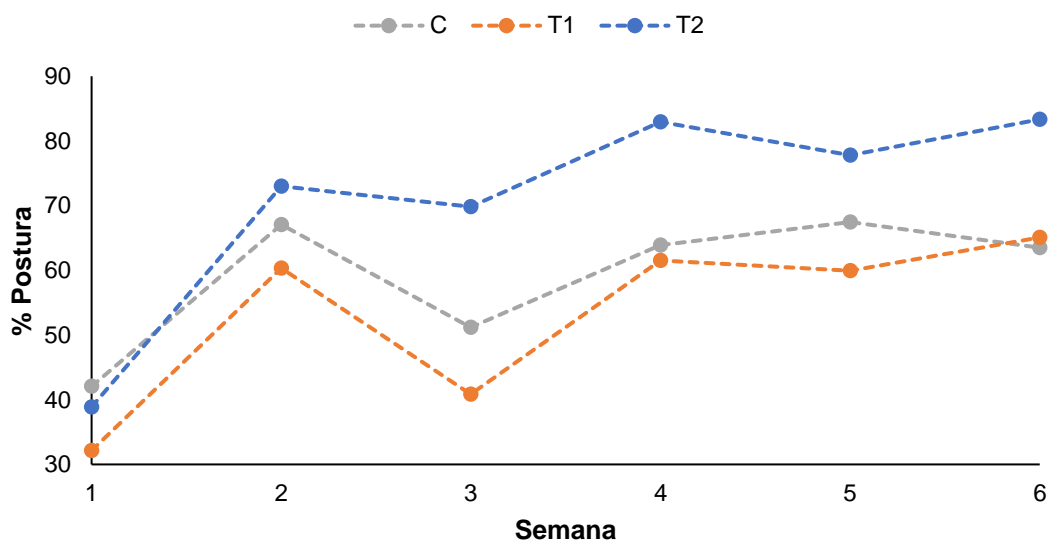


Figura 11. Efecto de *P. pentosaceus* UCO-23 (T1) y *L. plantarum* UCO-54 (T2) en la tasa de postura por semana.

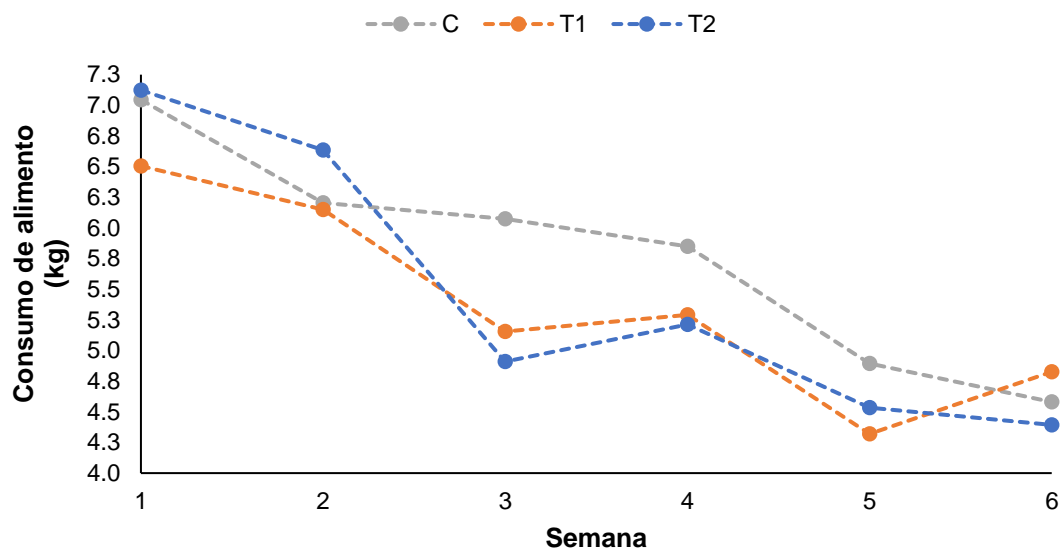


Figura 12. Efecto de *P. pentosaceus* UCO-23 (T1) y *L. plantarum* UCO-54 (T2) en el consumo de alimento por semana.

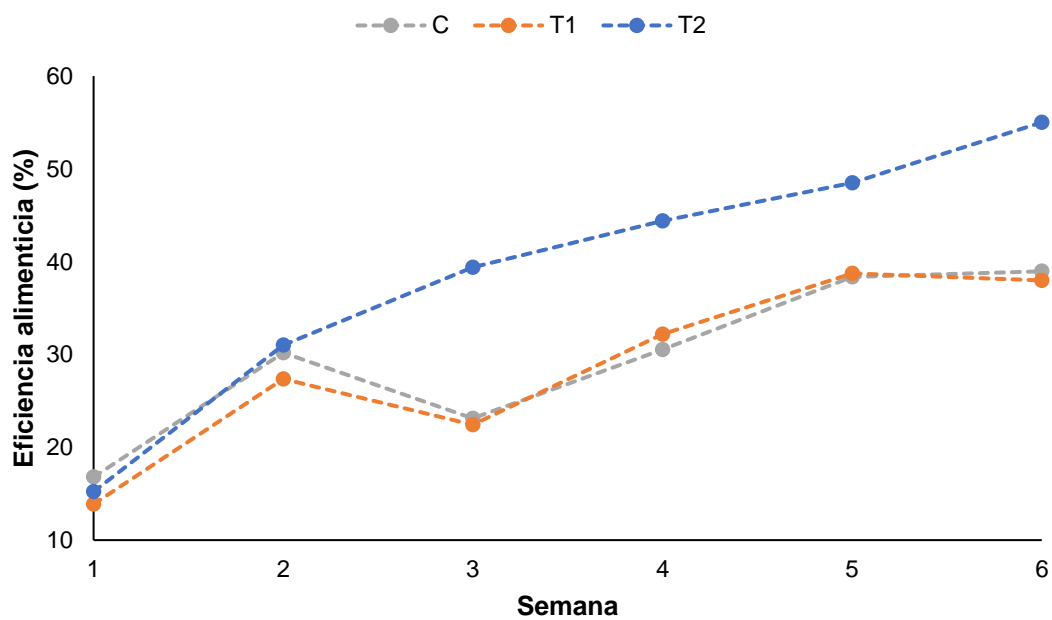


Figura 13. Efecto de *P. pentosaceus* UCO-23 (T1) y *L. plantarum* UCO-54 (T2) en la eficiencia alimenticia por semana.

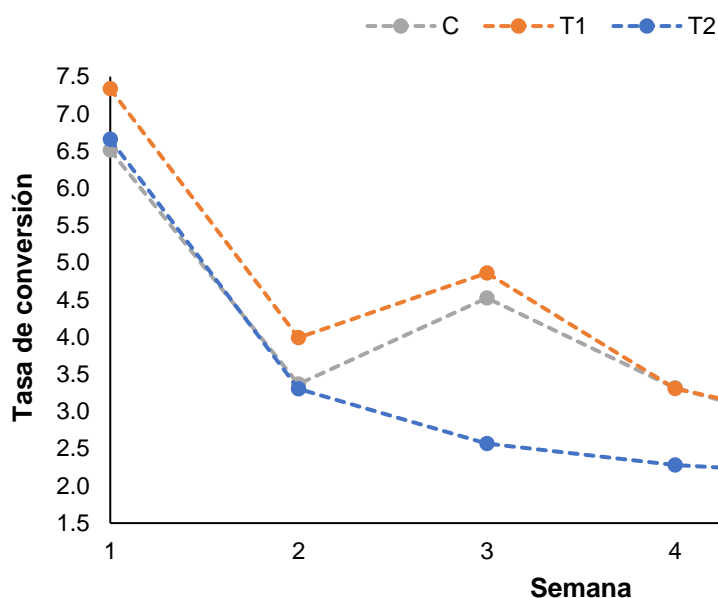


Figura 14. Efecto de *P. pentosaceus* UCO-23 (T1) y *L. plantarum* UCO-54 (T2) en la tasa de conversión alimenticia por semana.

A partir de la Figura 10 y 11, se evidenció en T2 un aumento en la producción de huevo desde la segunda semana de estudio; en contraste, T1 presenta un ligero incremento el cual no resultó significativo respecto al control. En cuanto al consumo de alimento (Figura 12), no se observa una tendencia clara entre los diferentes tratamientos. En términos de la eficiencia alimenticia, expresada en porcentaje, y tasa de conversión alimenticia (Figura 13 y 14, respectivamente), se muestra un cambio sustancial para el tratamiento con UCO-54 (T2) respecto al C y T1, esto se destaca principalmente desde la segunda semana de estudio. Ahora bien, en la Tabla 9 se muestran los efectos de cada tratamiento como promedio del periodo final (semana 5 y 6) de evaluación probiótica, donde para establecer diferencias significativas se incorporó el valor p.

Tabla 9. Efectos *P. pentosaceus* UCO-23 (T1) y *L. plantarum* UCO-54 (T2) en los parámetros productivos.

Parámetro	Tratamiento			EEM	Valor p
	C	T1	T2		
Producción diaria de huevos (%)	65.48±3.34 ^a	62.50±3.47 ^a	80.56±2.93 ^b	3.26	0.003
Consumo de alimento (g/gallina/día)	112.74±6.19	108.93±3.69	106.31±7.62	6.07	0.753
Eficiencia alimenticia (g huevo/g alimento)	0.39±0.02 ^a	0.41±0.03 ^{ab}	0.54±0.05 ^b	0.04	0.018
Tasa de conversión alimenticia (g alimento/g de huevo)	2.63±0.14 ^a	2.52±0.19 ^{ab}	1.94±0.18 ^b	0.17	0.026
Ganancia de peso (kg)	0.43±0.14 ^a	0.78±0.09 ^a	1.01±0.13 ^b	0.42	<0.001

Nota: ^{a,b} Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. EEM: error estándar de la media.

Los resultados indican una tasa de postura significativamente mayor ($p < 0.01$) con UCO-54 (T2, 80.55%) en comparación con C y T1. Lo anterior, se alinea con estudios sobre *Lactobacillus plantarum* donde fortalece la microbiota intestinal y permite un mejor uso de los nutrientes para la producción de huevos (Mikulski *et al.*, 2020; Qiao *et al.*, 2019). De forma similar, T2 tuvo diferencias significativas con el control respecto a la eficiencia alimenticia ($p=0.018$) y tasa de conversión alimenticia ($P=0.026$), reflejando una mayor capacidad de las aves para la transformación de alimento en producción de huevo. Por lo tanto, estos resultados sugieren que *L. plantarum* UCO-54 puede mejorar la utilización de los nutrientes, reduciendo los requerimientos alimenticios por unidad de producto. En términos de la ganancia de peso, este análisis se realizó comparando el peso de las gallinas al inicio y final del estudio, donde únicamente T2 presentó diferencias significativas ($p < 0.05$, 1 kg) respecto al control (0.43 kg) y T1 (0.78 kg). En general, T1 no mostró diferencias significativas con el control en ninguno de los parámetros productivos analizados.

Si bien es cierto que en el parámetro asociado al consumo de alimento no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, esto se explicaría por factores relacionados con la autorregulación de la ingesta de alimento en función de las necesidades energéticas de las aves de postura. Al respecto Xiang *et al.* (2019) indica que, independientemente del tratamiento, se espera que los probióticos influyan en la eficiencia en el uso de nutrientes a partir del consumo de alimento hacia una producción igual o superior que sin su incorporación. Lo anterior se correlaciona con estudios que han obtenido resultados similares mediante la suplementación de *Pediococcus spp.* y varias combinaciones de *Lactobacillus spp.*, en donde no hubo alteración en la cantidad total de alimento ingerido (Mikulski *et al.*, 2020; Naseem *et al.*, 2021).

5.2.2. Calidad del huevo

La calidad del huevo es un parámetro esencial en la producción de gallinas Hy-Line, cuyo propósito es la producción de huevos, que debe alcanzar tanto la aceptación comercial como nutricional. En relación con esto, esta investigación evaluó el efecto del uso de probióticos en la calidad del huevo considerando siete parámetros donde se incluyen el peso del huevo, altura de la albúmina, unidades Haugh, fuerza de la cáscara, grosor de la cáscara, color de la yema e índice de yema. En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos, comparando las diferencias significativas entre los distintos tratamientos empleados (C, T1 y T2).

Tabla 10. Efectos de *P. pentosaceus* UCO-23 (T1) y *L. plantarum* UCO-54 (T2) en la calidad del huevo.

Parámetro	Tratamiento			EEM	Valor p
	C	T1	T2		
P _{Huevo} (g)	65.87±1.54	70.41±1.11	68.97±1.15	1.28	0.080
AA (mm)	6.56±0.39 ^a	7.36±0.28 ^{ab}	8.47±0.31 ^b	0.33	0.003
U _{Haugh}	76.87±3.33 ^a	83.32±1.85 ^{ab}	89.68±1.56 ^b	2.38	0.004
FC (kgf)	3.41±0.29	3.65±0.21	3.52±0.23	0.25	0.785
GC (mm)	0.45±0.02 ^a	0.46±0.02 ^{ab}	0.50±0.01 ^b	0.02	0.017
CY (puntos)	10.83±0.19	10.50±0.12	10.67±0.14	0.15	0.265
IY	0.39±0.01 ^a	0.41±0.01 ^{ab}	0.41±0.01 ^b	0.01	0.029

Nota: P_{Huevo}, peso del huevo; AA, altura de la albúmina; U_{Haugh}, unidades Haugh; FC, fuerza de ruptura de la cáscara; GC, grosor de la cáscara; CY, color de yema; IY, índice de yema. ^{a,b} Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. EEM: error estándar de la media.

A pesar de que se observó una ligera tendencia hacia un mayor peso del huevo en los tratamientos probióticos estas diferencias no fueron estadísticamente significativas respecto al control ($p=0.080$). Este resultado indicaría que los probióticos pueden influir levemente en este parámetro, pero su efecto no es suficiente para superar las variaciones propias entre las aves. Por otra parte, con la suplementación de UCO-54 la altura de la albúmina fue significativamente mayor (8.47 mm, $p < 0.001$) en comparación con el control (6.56 mm) y T1 (7.36 mm). Así también se estimó un incremento en las unidades Haugh, donde T2 alcanzó un valor promedio de 89.68, considerado como un indicador de excelente calidad interna del huevo (Carvalho *et al.*, 2022). Estos resultados respaldan la hipótesis de que los probióticos mejoran la calidad del huevo al influir positivamente en la salud y función intestinal de las gallinas, facilitando una mejor asimilación de nutrientes esenciales para la producción de proteínas de calidad en la albúmina (Qiao *et al.*, 2019).

Pese a que no hubo diferencias significativas en la fuerza de la cáscara, T2 presentó un grosor promedio superior (0.50 mm, $p < 0.05$) en comparación con el control y T1 (0.45

mm y 0.46 mm, respectivamente). Lo anterior preliminarmente sugiere que *L. plantarum* UCO-54 pudo mejorar la biodisponibilidad de calcio en las gallinas, promoviendo la formación de cáscaras más gruesas y, potencialmente, más resistentes (Farran *et al.*, 2024). En términos del color de la yema no se observaron diferencias significativas entre tratamientos; sin embargo, esto depende fundamentalmente de los pigmentos carotenoides propios de la dieta, lo cual no era el alcance de este estudio. Por último, se destaca que el índice de yema fue significativamente mayor en T2 (0.41, $p < 0.01$) en comparación con el control (0.39), indicando mayor firmeza y calidad estructural. Este último parámetro es un indicador de frescura y de calidad del huevo, y su incremento podría estar relacionado con un mejor balance nutricional inducido por el probiótico (Jha *et al.*, 2020; Such *et al.*, 2021).

5.2.3. Parámetros ambientales

Los parámetros ambientales son fundamentales para determinar el impacto de las prácticas intensivas y las posibles mejoras derivadas del uso de probióticos, sobre todo en la generación gases de efecto invernadero (Ryu *et al.*, 2018); sin embargo, esta evaluación ha sido escasamente abordada por la literatura científica. En este estudio, se analizaron variables de interés ambiental a partir del muestreo de las heces, como la concentración de nitrógeno amoniacal, nitrógeno total y la humedad del guano a partir de la determinación de la materia seca.

Tabla 11. Efectos de *P. pentosaceus* UCO-23 (T1) y *L. plantarum* UCO-54 (T2) en los parámetros ambientales.

Parámetro		Tratamiento			EEM	Valor p
		C	T1	T2		
MS	g/100 g MS	31.94±0.73 ^a	28.59±0.70 ^b	27.49±0.36 ^b	0.62	<0.001
NT	g/100 g MS	4.82±0.19	4.66±0.17	5.13±0.22	0.19	0.248
N-NH ₃	g/100 g MS	2.60±0.33	4.70±1.28	6.12±1.43	1.13	0.117
PC	g/100 g MS	9.63±0.44	8.35±0.48	8.81±0.35	0.43	0.132

Nota: MS, materia seca; NT, nitrógeno total; N-NH₃, nitrógeno amoniacal; PC, proteína cruda. ^{a,b} Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. EEM: error estándar de la media.

Se observaron diferencias significativas en la materia seca, donde el grupo control presentó valores superiores (31.94 ± 0.73) en comparación con T2 (28.59 ± 0.70), lo que indicaría que UCO-54 podría haber favorecido la retención de humedad en las heces. Aunque este efecto podría representar un desafío en el manejo de residuos, también podría estar relacionado a una fermentación más activa en el tracto digestivo, lo que explicaría parcialmente los resultados productivos y calidad de los huevos observados en T2, ya que una microbiota equilibrada contribuye a una mayor disponibilidad de metabolitos clave para la producción (Jha *et al.*, 2020). No obstante, no se encontraron diferencias significativas en los demás parámetros analizados ($p > 0.05$), ya sea por la variabilidad natural de los datos o a la magnitud limitada del efecto de los tratamientos en estas variables específicas. Los tratamientos con probióticos mostraron una tendencia hacia mayores concentraciones de compuestos nitrogenados (NT y N-NH₃), lo que podría estar relacionado a una mayor cantidad de microorganismos en las excretas o un efecto en el metabolismo de las aves (Jha *et al.*, 2020; Rehman *et al.*, 2020; Such *et al.*, 2021). Respecto a la proteína cruda, que permitió obtener los valores de la digestibilidad, no se observaron diferencias

significativas entre tratamientos ($P > 0.05$), lo que indica que la suplementación probiótica no afectó de manera relevante la excreción de proteínas, manteniéndose una digestión y absorción proteica similar entre grupos. Por otro lado, la ausencia de diferencias significativas en DMS y DPC entre los tratamientos (Tabla 12) indicaría que la suplementación probiótica no redujo la capacidad de las aves para digerir los componentes básicos del alimento, lo cual confirma que los probióticos no generan un impacto negativo en la eficiencia digestiva. Este hallazgo podría estar relacionado con los resultados positivos en la tasa de conversión alimenticia observados con UCO-54 (T2), destacando un posible efecto del probiótico en la utilización de nutrientes a nivel sistémico (Jeni *et al.*, 2021).

Tabla 12. Digestibilidad de Materia Seca (DMS) y Proteína Cruda (DPC).

Parámetro		Tratamiento			EEM	Valor p
		C	T1	T2		
DMS	%	75.29	78.15	79.84	1.628	0.251
DPC	%	35.61	41.15	38.29	4.762	0.732

Nota: Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. EEM: error estándar de la media.

Desde el punto de vista ambiental, los resultados de la calidad de las heces podrían parecer poco alentadores relacionándolos con la generación de gases de efecto invernadero y la demanda oxígeno en cuerpos de agua (Ryu *et al.*, 2018; Such *et al.*, 2023); sin embargo, estas tendencias deben ser evaluadas en estudios a mayor escala para confirmar su impacto ambiental. De esta manera, surge la necesidad de ajustar las dosis y duración limitada del estudio (6 semanas), que podría no haber sido suficiente para observar adaptaciones completas en la microbiota intestinal de las aves o para establecer un efecto estable de los probióticos.

En resumen, la suplementación con *L. plantarum* UCO-54 mostró beneficios claros en parámetros productivos y en la calidad del huevo. Además, la estabilidad de la digestibilidad y los indicadores de proteína cruda sugieren que este probiótico no solo es compatible con una producción eficiente, sino que podría optimizar la conversión de nutrientes en productos avícolas de alto valor. Por lo tanto, para garantizar su sustentabilidad, sería recomendable evaluar estrategias de manejo de residuos que mitiguen posibles efectos negativos asociados al incremento de compuestos nitrogenados e implementar esta investigación en aves de diferentes edades, línea genética o capacidad del sistema (mayor escala) para determinar el efecto probiótico de UCO-54 en las diferentes etapas productivas.

6. CONCLUSIÓN

Se demostró que bacterias lácticas aisladas de la Antártica poseen efectos probióticos potenciales para una producción avícola sustentable. Entre los resultados *in vitro* se destacan *Lactiplantibacillus plantarum* UCO-54 y *Pediococcus pentosaceus* UCO-23 por sus propiedades biotecnológicas como tolerar condiciones de pH y concentraciones de sales biliares adversas, su capacidad de adhesión, inocuidad y actividad antagonista frente a patógenos de referencia de interés para la avicultura, factores por los cuales se seleccionaron para determinar su efecto *in vivo* en gallinas Hy-Line W-36.

Al respecto, se concluyó que el tratamiento probiótico con UCO-54 (T2) presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) en la postura, eficiencia alimenticia, tasa de conversión alimenticia y en la ganancia de peso. De manera similar, T2 promovió una mayor calidad interna del huevo, grosor de la cáscara e índice de yema. No obstante, la mayoría de los parámetros ambientales no presentaron diferencias significativas entre tratamientos. La suplementación con UCO-54 favoreció la retención de humedad en las heces, lo que sugiere una fermentación más activa de nutrientes o la presencia de microorganismos en el guano. A pesar de que los contenidos nitrogenados en las heces representan desafíos para el manejo de residuos, la estabilidad de la digestibilidad con UCO-54 podría optimizar la conversión de nutrientes en productos avícolas de alto valor. Se sugiere realizar estudios adicionales ajustando la dosis, tiempo experimental, mayor escala y en aves en diferentes etapas productivas para garantizar la aplicación sostenible de *L. plantarum* UCO-54, ya que la cepa representaría una alternativa viable como probiótico en sistemas de producción avícola intensiva.

7. LITERATURA CITADA

1. Abdelli, N., Solà-Oriol, D., & Pérez, J. F. (2021). Phytogetic Feed Additives in Poultry: Achievements, Prospective and Challenges. *Animals (Basel)*, 11(12).
<https://doi.org/10.3390/ani11123471>
2. Abriouel, H., Casado Muñoz, M. D. C., Lavilla Lerma, L., Pérez Montoro, B., Bockelmann, W., Pichner, R., Kabisch, J., Cho, G. S., Franz, C., Gálvez, A., & Benomar, N. (2015). New insights in antibiotic resistance of Lactobacillus species from fermented foods. *Food Res Int*, 78, 465-481.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.016>
3. Anandharaj, M., & Sivasankari, B. (2014). Isolation of potential probiotic Lactobacillus oris HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(2), 153-159.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.01.015>
4. Anandharaj, M., Sivasankari, B., Santhanakaruppu, R., Manimaran, M., Rani, R. P., & Sivakumar, S. (2015). Determining the probiotic potential of cholesterol-reducing Lactobacillus and Weissella strains isolated from gherkins (fermented cucumber) and south Indian fermented koozh. *Res Microbiol*, 166(5), 428-439.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.03.002>
5. Andrew Selaledi, L., Mohammed Hassan, Z., Manyelo, T. G., & Mabelebele, M. (2020). The Current Status of the Alternative Use to Antibiotics in Poultry Production: An African Perspective. *Antibiotics (Basel)*, 9(9).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9090594>

6. Anisimova, E. A., & Yarullina, D. R. (2019). Antibiotic Resistance of LACTOBACILLUS Strains. *Current Microbiology*, 76(12), 1407-1416. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01769-7>
7. Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A., Tsakalidou, E., Nychas, G. J., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiol*, 33(2), 282-291. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>
8. Asha, G. D. (2012). Antagonistic potential of Lactobacillus spp. against enteropathogenic bacteria; purification and characterization of their bacteriocins. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 4(5), 265-269.
9. Bacanlı, M., & Başaran, N. (2019). Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and Chemical Toxicology*, 125, 462-466. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.033>
10. Baccigalupi, L., Di Donato, A., Parlato, M., Luongo, D., Carbone, V., Rossi, M., Ricca, E., & De Felice, M. (2005). Small surface-associated factors mediate adhesion of a food-isolated strain of Lactobacillus fermentum to Caco-2 cells. *Research in Microbiology*, 156(7), 830-836. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.05.001>
11. Barbour, E. (2019). *Advantages and disadvantages of Coccidiosis control programs in poultry*. King Abdulaziz University. Retrieved December 12 from <https://zootecnicainternational.com/featured/advantages-disadvantages-coccidiosis-control-programs-poultry/>

12. Burkholder, J., Libra, B., Weyer, P., Heathcote, S., Kolpin, D., Thorne, P. S., & Wichman, M. (2007). Impacts of waste from concentrated animal feeding operations on water quality. *Environ Health Perspect*, *115*(2), 308-312. <https://doi.org/10.1289/ehp.8839>
13. Bustos, A. Y., Font de Valdez, G., Fadda, S., & Taranto, M. P. (2018). New insights into bacterial bile resistance mechanisms: the role of bile salt hydrolase and its impact on human health. *Food Research International*, *112*, 250-262. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.035>
14. Carvalho, C. L., Andretta, I., Galli, G. M., Stefanello, T. B., Camargo, N. D., Marchiori, M., Melchior, R., & Kipper, M. (2022). Effects of Dietary Probiotic Supplementation on Egg Quality during Storage. *Poultry*, *1*(3), 180-192.
15. Carvalho, R., Palme, R., & Vasconcellos, A. (2018). An integrated analysis of social stress in laying hens: The interaction between physiology, behaviour, and hierarchy. *Behavioural processes*, *149*, 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.01.016>
16. Chen, W. (2019). *Lactic Acid Bacteria Bioengineering and Industrial Applications: Bioengineering and Industrial Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-7283-4>
17. Chen, X., Chen, W. W., Ci, W. J., Zheng, Y. Y., Han, X. Y., Huang, J. P., & Zhu, J. J. (2023). Effects of Dietary Supplementation with *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus subtilis* on Mucosal Immunity and Intestinal Barrier Are Associated with Its Modulation of Gut Metabolites and

- Microbiota in Late-Phase Laying Hens. *PROBIOTICS AND ANTIMICROBIAL PROTEINS*, 15(4), 912-924. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09923-7>
18. Collaborators, A. R. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0)
19. Deng, Z. X., Hou, K. W., Zhao, J. C., & Wang, H. F. (2022). The Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria and Their Applications in Animal Husbandry. *CURRENT MICROBIOLOGY*, 79(1), Article 22. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02722-3>
20. Dixon, B., Kilonzo-Nthenge, A., Nzomo, M., Bhogaju, S., & Nahashon, S. (2022). Evaluation of Selected Bacteria and Yeast for Probiotic Potential in Poultry Production. *MICROORGANISMS*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040676>
21. Duar, R. M., Lin, X. B., Zheng, J., Martino, M. E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M. E., Leulier, F., Gänzle, M., & Walter, J. (2017). Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(Supp_1), S27-S48. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux030>
22. Ehrmann, M. A., Kurzak, P., Bauer, J., & Vogel, R. F. (2002). Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J Appl Microbiol*, 92(5), 966-975. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01608.x>
23. Elhassan, M. M. O., Ali, A. M., Kehlet, A. B., Ali, O. H. A., & Harrington, D. (2021). The Response of Broiler Chicks to Dietary Supplementation with a

- Probiotic, Acidifiers Blend, and Their Combination. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 23.
24. Farran, M., El Masry, B., Kaouk, Z., & Shaib, H. (2024). Impact of Dietary *Lactobacillus plantarum* Postbiotics on the Performance of Layer Hens under Heat Stress Conditions. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 14, 39-55. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2024.143004>
25. Felten, A., Barreau, C., Bizet, C., Lagrange Philippe, H., & Philippon, A. (1999). *Lactobacillus* Species Identification, H₂O₂ Production, and Antibiotic Resistance and Correlation with Human Clinical Status. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3), 729-733. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.3.729-733.1999>
26. Fuentes, O. (2024). *Boletín de carne bovina, marzo 2024*. <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletines/boletin-de-carne-bovina-marzo-2024#:~:text=Partimos%20el%202024%2C%20con%20un,mil%20toneladas%20de%20carne%2C%20aproximadamente>
27. Gadde, U., Kim, W. H., Oh, S. T., & Lillehoj, H. S. (2017). Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. *Animal Health Research Reviews*, 18(1), 26-45. <https://doi.org/10.1017/S1466252316000207>
28. Ganapathy, K., & Parthiban, S. (2024). Pros and Cons on Use of Live Viral Vaccines in Commercial Chicken Flocks. *Avian Dis*, 67(4), 410-420. <https://doi.org/10.1637/aviandiseases-D-23-99998>

29. García-Cayuela, T., Korany, A. M., Bustos, I., P. Gómez de Cadiñanos, L., Requena, T., Peláez, C., & Martínez-Cuesta, M. C. (2014). Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International*, 57, 44-50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.010>
30. García-Reyes, R. A., García-Cancino, A., Arrevillaga-Boni, G., Espinoza-Monje, M., Gutiérrez-Zamorano, C., Arrizon, J., & González-Avila, M. (2023). Identification and Characterization of Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* BI-59.1 Isolated from tejuino and Its Capacity to Produce Biofilms. *Curr Microbiol*, 80(7), 220. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03319-8>
31. García, A., Navarro, K., Sanhueza, E., Pineda, S., Pastene, E., Quezada, M., Henríquez, K., Karlyshev, A., Villena, J., & González, C. (2017). Characterization of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-*Helicobacter pylori* activity. *Electronic Journal of Biotechnology*, 25, 75-83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.11.008>
32. Georgieva, R. N., Iliev, I. N., Chipeva, V. A., Dimitonova, S. P., Samelis, J., & Danova, S. T. (2008). Identification and in vitro characterisation of *Lactobacillus plantarum* strains from artisanal Bulgarian white brined cheeses. *Journal of Basic Microbiology*, 48(4), 234-244. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jobm.200700355>
33. Giménez, M., Azziz, G., Gill, P. R., & Batista, S. (2019). Horizontal Gene Transfer Elements: Plasmids in Antarctic Microorganisms. In S. Castro-Sowinski (Ed.),

The Ecological Role of Micro-organisms in the Antarctic Environment (pp. 85-107). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02786-5_5

34. Gržinić, G., Piotrowicz-Cieślak, A., Klimkowicz-Pawlas, A., Górny, R. L., Ławniczek-Wałczyk, A., Piechowicz, L., Olkowska, E., Potrykus, M., Tankiewicz, M., Krupka, M., Siebielec, G., & Wolska, L. (2023). Intensive poultry farming: A review of the impact on the environment and human health. *SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT*, 858, 160014. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160014>
35. Han, Q., Kong, B., Chen, Q., Sun, F., & Zhang, H. (2017). In vitro comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics. *Journal of Functional Foods*, 32, 391-400. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.020>
36. He, Y., Liu, X., Dong, Y., Lei, J., Ito, K., & Zhang, B. (2021). Enterococcus faecium PNC01 isolated from the intestinal mucosa of chicken as an alternative for antibiotics to reduce feed conversion rate in broiler chickens. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01609-z>
37. Hertzberger, R., Arents, J., Dekker, H. L., Pridmore, R. D., Gysler, C., Kleerebezem, M., & de Mattos, M. J. (2014). H₂O₂ production in species of the *Lactobacillus acidophilus* group: a central role for a novel NADH-dependent flavin reductase. *Appl Environ Microbiol*, 80(7), 2229-2239. <https://doi.org/10.1128/aem.04272-13>

38. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *11*(8), 506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
39. Im, E. J., Lee, H. H., Kim, M., & Kim, M. K. (2023). Evaluation of Enterococcal Probiotic Usage and Review of Potential Health Benefits, Safety, and Risk of Antibiotic-Resistant Strain Emergence. *Antibiotics (Basel)*, *12*(8). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081327>
40. Jannasch, H., & Egli, T. (1993). Microbial growth kinetics: a historical perspective. *Antonie van Leeuwenhoek*, *63*, 213-224. <https://doi.org/10.1007/BF00871219>
41. Jeni, R. E., Dittoe, D. K., Olson, E. G., Lourenco, J., Corcionivoschi, N., Ricke, S. C., & Callaway, T. R. (2021). Probiotics and potential applications for alternative poultry production systems. *Poultry Science*, *100*(7), 101156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101156>
42. Jha, R., Das, R., Oak, S., & Mishra, P. (2020). Probiotics (Direct-Fed Microbials) in Poultry Nutrition and Their Effects on Nutrient Utilization, Growth and Laying Performance, and Gut Health: A Systematic Review. *Animals (Basel)*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/ani10101863>
43. Juturu, V., & Wu, J. C. (2018). Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnology Advances*, *36*(8), 2187-2200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.007>

44. Karimi, S., Azizi, F., Nayeb-Aghaee, M., & Mahmoodnia, L. (2018). The antimicrobial activity of probiotic bacteria *Escherichia coli* isolated from different natural sources against hemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Electron Physician*, 10(3), 6548-6553. <https://doi.org/10.19082/6548>
45. Komarek, A. M., Dunston, S., Enahoro, D., Godfray, H. C. J., Herrero, M., Mason-D'Croz, D., Rich, K. M., Scarborough, P., Springmann, M., Sulser, T. B., Wiebe, K., & Willenbockel, D. (2021). Income, consumer preferences, and the future of livestock-derived food demand. *Global Environmental Change*, 70, 102343. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2021.102343>
46. Kumar, I., & Bhattacharya, J. (2019). Assessment of the role of silver nanoparticles in reducing poultry mortality, risk and economic benefits. *Applied Nanoscience*, 9(6), 1293-1307. <https://doi.org/10.1007/s13204-018-00942-x>
47. Kuralkar, P., & Kuralkar, S. V. (2021). Role of herbal products in animal production – An updated review. *Journal of Ethnopharmacology*, 278, 114246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114246>
48. Lajqi Berisha, N., Poceva Panovska, A., & Hajrulai-Musliu, Z. (2024). Antibiotic Resistance and Aquatic Systems: Importance in Public Health. *Water*, 16(17).
49. Leska, A., Nowak, A., Szulc, J., Motyl, I., & Czarnecka-Chrebelska, K. H. (2022). Antagonistic Activity of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria against Honeybee (*Apis mellifera* L.) Pathogens. *Pathogens*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/pathogens11111367>
50. Li, Y., Arulnathan, V., Heidari, M. D., & Pelletier, N. (2022). Design considerations for net zero energy buildings for intensive, confined poultry

- production: A review of current insights, knowledge gaps, and future directions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 154, 111874. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111874>
51. Ly, D., Mayrhofer, S., & Domig, K. (2022). An Evaluation of the Phenotypic Antibiotic Susceptibility of Potential Lactic Acid Bacteria Starter Cultures Isolated From Cambodian Fermented Foods. *Frontiers in Food Science and Technology*, 2, 892319. <https://doi.org/10.3389/frfst.2022.892319>
52. Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. (2018). Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>
53. Mappley, L. J., Tchórzewska, M. A., Nunez, A., Woodward, M. J., Bramley, P. M., & La Ragione, R. M. (2013). Oral treatment of chickens with *Lactobacillus reuteri* LM1 reduces *Brachyspira pilosicoli*-induced pathology. *J Med Microbiol*, 62(Pt 2), 287-296. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.051862-0>
54. Mehdi, Y., Létourneau-Montminy, M.-P., Gaucher, M.-L., Chorfi, Y., Suresh, G., Rouissi, T., Brar, S. K., Côté, C., Ramirez, A. A., & Godbout, S. (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition*, 4(2), 170-178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.002>
55. Michalak, I., & Mahrose, K. (2020). Seaweeds, Intact and Processed, as a Valuable Component of Poultry Feeds. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(8).

56. Mikulski, D., Jankowski, J., Mikulska, M., & Demey, V. (2020). Effects of dietary probiotic (*Pediococcus acidilactici*) supplementation on productive performance, egg quality, and body composition in laying hens fed diets varying in energy density. *Poultry Science*, *99*(4), 2275-2285. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.046>
57. Mörschbacher, A. P., Berghahn, E., Shibuya, F. Y., Cardoso, M. L., Ulguim, G. K., de Freitas Michelin, N., Torgeski, N., Vivian, T. P., Wissmann, D., de Camargo, F. C. d. L. S., de Andrade, G. M., Sturza, D. A. F., dos Santos, H. F., Dilkin, P., Timmers, L. F. S. M., & Granada, C. E. (2023). Feeding laying hens with lactobacilli improves internal egg quality and animal health. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *40*(1), 5. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03820-z>
58. Mund, M., Khan, U. H., Tahir, U., Mustafa, B., & Fayyaz, A. (2016). Antimicrobial drug residues in poultry products and implications on public health: a Review. *International Journal of Food Properties*, *20*. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1212874>
59. Nallala, V., & Jeevaratnam, K. (2018). Probiotic Evaluation of Antimicrobial *Lactobacillus plantarum* VJC38 Isolated from the Crop of Broiler Chicken. *Microbiology*, *87*(3), 350-362. <https://doi.org/10.1134/S0026261718030062>
60. Naseem, S., Willits, N., & King, A. J. (2021). Varying combinations of *Lactobacillus* species: impact on laying hens' performance, nitrogenous compounds in manure, serum profile, and uric acid in the liver.

TRANSLATIONAL ANIMAL SCIENCE, 5(2), Article txab018.

<https://doi.org/10.1093/tas/txab018>

61. O'Neill, J. (2014). Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*.
<https://wellcomecollection.org/works/rdpck35v/items>
62. Ocana, V. S., Bru, E., De Ruiz Holgado, A. A., & Nader-Macias, M. E. (1999). Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. *J Gen Appl Microbiol*, 45(5), 203-212. <https://doi.org/10.2323/jgam.45.203>
63. OECD, Food, & Nations, A. O. o. t. U. (2023). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2023-2032*. <https://doi.org/doi:https://doi.org/10.1787/08801ab7-en>
64. OECD, Food, & Nations, A. O. o. t. U. (2024). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2024-2033*. <https://doi.org/doi:https://doi.org/10.1787/4c5d2cfb-en>
65. OECD/FAO. (2023). *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2023-2032*.
66. OMS. (2016). *Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos*. Organización Mundial de la Salud. <https://iris.who.int/handle/10665/255204>
67. Özcelik, S., Kuley, E., & Özogul, F. (2016). Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT*, 73, 536-542.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.066>
68. Peek, H. W., & Landman, W. J. (2011). Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Vet Q*, 31(3), 143-161.
<https://doi.org/10.1080/01652176.2011.605247>
69. Peñafiel, E. (2024). Encuesta de Producción de Huevos 2022 a 2024. In: Chile: Instituto Nacional de Estadísticas.

70. Peres, C. M., Alves, M., Hernandez-Mendoza, A., Moreira, L., Silva, S., Bronze, M. R., Vilas-Boas, L., Peres, C., & Malcata, F. X. (2014). Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 234-246.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.003>
71. Pruthviraj, Naik, M. K., Ganesha Naik, R., Gangadhara Naik, B., Nandish, M. S., Ekabote, S. D., & Sreenivasa, M. Y. (2023). Investigation on antibacterial, probiotic and plant growth promoting attributes of *Enterococcus faecium* MYSBC14 from Blue Cherry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 22(7), 439-448.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jssas.2023.04.003>
72. Qiao, H., Shi, H., Zhang, L., Song, Y., Zhang, X., & Bian, C. (2019). Effect of *Lactobacillus Plantarum* Supplementation on Production Performance and Fecal Microbial Composition in Laying Hens. *Open Life Sci*, 14, 69-79.
<https://doi.org/10.1515/biol-2019-0009>
73. Rehman, A., Arif, M., Sajjad, N., Al-Ghadi, M. Q., Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Alhimaidi, A. R., Elnesr, S. S., Almutairi, B. O., Amran, R. A., Hussein, E. O. S., & Swelum, A. A. (2020). Dietary effect of probiotics and prebiotics on broiler performance, carcass, and immunity. *Poult Sci*, 99(12), 6946-6953.
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.043>
74. Ribeiro, S. C., Coelho, M. C., & Silva, C. C. G. (2021). A rapid screening method to evaluate acidifying activity by lactic acid bacteria. *Journal of*

Microbiological Methods, 185, 106227.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106227>

75. Rodríguez-Sánchez, S., Fernández-Pacheco, P., Seseña, S., Pintado, C., & Palop, M. L. (2021). Selection of probiotic *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity to be used as biocontrol agents in food industry. *LWT*, 143, 111142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111142>
76. Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Poeta, P., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2006). Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111(3), 234-240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.007>
77. Rosenberg, M., Judes, H., & Weiss, E. (1983). Cell surface hydrophobicity of dental plaque microorganisms in situ. *Infect Immun*, 42(2), 831-834. <https://doi.org/10.1128/iai.42.2.831-834.1983>
78. Rozos, G., Voidarou, C., Stavropoulou, E., Skoufos, I., Tzora, A., Alexopoulos, A., & Bezirtzoglou, E. (2018). Biodiversity and Microbial Resistance of *Lactobacilli* Isolated From the Traditional Greek Cheese Kopanisti. *Front Microbiol*, 9, 517. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00517>
79. Ruiz, L., Margolles, A., & Sánchez, B. (2013). Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* [Mini Review]. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00396>
80. Ruvalcaba-Gómez, J. M., Villagrán, Z., Valdez-Alarcón, J. J., Martínez-Núñez, M., Gomez-Godínez, L. J., Ruesga-Gutiérrez, E., Anaya-Esparza, L. M., Arteaga-

- Garibay, R. I., & Villarruel-López, A. (2022). Non-Antibiotics Strategies to Control Salmonella Infection in Poultry. *Animals*, 12(1).
81. Ryu, H.-D., Kim, M.-S., Chung, E. G., Baek, U.-i., Kim, S.-J., Kim, D.-W., Kim, Y. S., & Lee, J.-K. (2018). Assessment and identification of nitrogen pollution sources in the Cheongmi River with intensive livestock farming areas, Korea. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(14), 13499-13510. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1554-9>
82. Salas-Jara, M. J., Sanhueza, E. A., Retamal-Díaz, A., González, C., Urrutia, H., & García, A. (2016). Probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C biofilm formation on AGS and Caco-2 cells and *Helicobacter pylori* inhibition. *Biofouling*, 32(10), 1245-1257. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1249367>
83. Shi, Y., Zhai, M., Li, J., & Li, B. (2020). Evaluation of safety and probiotic properties of a strain of *Enterococcus faecium* isolated from chicken bile. *J Food Sci Technol*, 57(2), 578-587. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04089-7>
84. Singla, V., Mandal, S., Sharma, P., Anand, S., & Tomar, S. K. (2018). Antibiotic susceptibility profile of *Pediococcus* spp. from diverse sources. *3 Biotech*, 8(12), 489. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1514-6>
85. Stefańska, I., Kwiecień, E., Józwiak-Piasecka, K., Garbowska, M., Binek, M., & Rzewuska, M. (2021). Antimicrobial Susceptibility of Lactic Acid Bacteria Strains of Potential Use as Feed Additives - The Basic Safety and Usefulness Criterion. *Front Vet Sci*, 8, 687071. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.687071>

86. Such, N., Farkas, V., Csitári, G., Pál, L., Márton, A., Menyhárt, L., & Dublec, K. (2021). Relative Effects of Dietary Administration of a Competitive Exclusion Culture and a Synbiotic Product, Age and Sampling Site on Intestinal Microbiota Maturation in Broiler Chickens. *Veterinary Sciences*, 8(9).
87. Such, N., Mezőlaki, Á., Rawash, M. A., Tewelde, K. G., Pál, L., Wágner, L., Schermann, K., Poór, J., & Dublec, K. (2023). Diet Composition and Using Probiotics or Symbiotics Can Modify the Urinary and Faecal Nitrogen Ratio of Broiler Chicken's Excreta and Also the Dynamics of In Vitro Ammonia Emission. *ANIMALS*, 13(3).
88. Tang, H., Huang, W., & Yao, Y. F. (2023). The metabolites of lactic acid bacteria: classification, biosynthesis and modulation of gut microbiota. *Microb Cell*, 10(3), 49-62. <https://doi.org/10.15698/mic2023.03.792>
89. Terraf, M. C. L., Juárez Tomás, M. S., Nader-Macías, M. E. F., & Silva, C. (2012). Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. *Journal of Applied Microbiology*, 113(6), 1517-1529. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05429.x>
90. Tiseo, K., Huber, L., Gilbert, M., Robinson, T. P., & Van Boeckel, T. P. (2020). Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030. *Antibiotics*, 9(12).
91. Vetrova, A. A., Ivanova, A. A., Petrikov, K. V., Gavrichkova, O., Korneykova, M. V., & Sazonova, O. I. (2024). Antibiotic Resistance as a Functional Characteristic of Urban Dust Particles' Microbial Communities. *Biology*, 13(12).

92. Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., & Drider, D. (2019). Benefits and Inputs From Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins as Alternatives to Antibiotic Growth Promoters During Food-Animal Production. *Front Microbiol*, *10*, 57. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>
93. Xiang, Q., Wang, C., Zhang, H., Lai, W., Wei, H., & Peng, J. (2019). Effects of Different Probiotics on Laying Performance, Egg Quality, Oxidative Status, and Gut Health in Laying Hens. *Animals (Basel)*, *9*(12). <https://doi.org/10.3390/ani9121110>
94. Zeitz, J. O., Fleischmann, A., Ehbrecht, T., Most, E., Friedrichs, S., Whelan, R., Gessner, D. K., Failing, K., Lütjohann, D., & Eder, K. (2020). Effects of supplementation of DL-methionine on tissue and plasma antioxidant status during heat-induced oxidative stress in broilers. *Poultry Science*, *99*(12), 6837-6847. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.082>
95. Zhou, X., Wang, J., Lu, C., Liao, Q., Gudda, F. O., & Ling, W. (2020). Antibiotics in animal manure and manure-based fertilizers: Occurrence and ecological risk assessment. *Chemosphere*, *255*, 127006. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127006>