

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRÍCOLA



**ANÁLISIS DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTERIAS ÁCIDO
LÁCTICAS EN PINGÜINOS ANTÁRTICOS: UN ENFOQUE HACIA LA
PRESERVACIÓN**

CARMEN GLORIA MEDINA RUBILAR

HABILITACIÓN PROFESIONAL
PRESENTADA A LA FACULTAD DE
INGENIERÍA AGRÍCOLA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN,
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AMBIENTAL

CHILLÁN-CHILE

2022

**ANÁLISIS DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTERIAS ÁCIDO
LÁCTICAS EN PINGÜINOS ANTÁRTICOS: UN ENFOQUE HACIA LA
PRESERVACIÓN**

Aprobado por:

Javier Ferrer Valenzuela
Ingeniero Civil Químico, Dr.
Profesor Asociado

Profesor Guía

Mónica Montory González
Bioquímica, Dra.
Profesor Asistente

Profesor Co-Guía

Apolinaria García Cancino
Ciencias Biológicas, Dra.
Profesor Titular

Profesor Asesor

Nicole Uslar Valle
Ingeniero Civil Agrícola, Ph. D.
Profesor Asistente

Director de Departamento

María Eugenia González Rodríguez
Ingeniero Agrónomo, Ph. D.
Profesor Asociado

Decana

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a cada uno de los docentes que hicieron posible esta investigación, en especial a mi profesor guía el Dr. Javier Ferrer por sus enseñanzas, paciencia y apoyo brindado durante todo este tiempo.

Asimismo, expresar mi agradecimiento a cada una de las personas que se desempeñan en el laboratorio de Biotecnología Hidroambiental (LABHI) de la Universidad de Concepción, Campus Chillán, por toda la ayuda brindada y paciencia.

Gracias a mi familia. Mis padres por creer en mí y darme una segunda oportunidad. A mi prima Angela, por tu apoyo incondicional, paciencia y comprensión, gracias por ser quien eres.

A mis amigos de la universidad, por cada momento compartido y sonrisas vividas. Pero, sobre todo, por alentarme cuando no creía en mis capacidades. Finalmente, a mi gatito Fotosíntesis, mi peludo remedio contra el estrés, quien me enseñó que todo tiene su momento, y cada cosa su tiempo. Gracias por llegar a mi vida.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
RESUMEN.....	1
SUMMARY	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo General.....	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. METODOLOGÍA.....	16
3.1. Muestras de origen antártico	16
3.2. Inoculación y condiciones generales de crecimiento	17
3.3. Selección de cepas BAL con potencial probiótico <i>in vitro</i>	17
3.3.1. Tolerancia al cambio de pH.....	17
3.3.2. Resistencia en presencia de sales biliares.....	18
3.3.3. Hidrofobicidad de la superficie celular.....	18
3.3.4. Actividad antimicrobiana	19
3.4. Análisis estadístico	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1. Tolerancia al cambio de pH	21
4.2. Resistencia en presencia de sales biliares	24
4.3. Hidrofobicidad de la superficie celular	27
4.4. Actividad antimicrobiana.....	29
5. CONCLUSIÓN.....	33
6. LITERATURA CITADA	35
7. APÉNDICE	56

ÍNDICE DE TABLAS

En el texto	Página
Tabla 1. Cuadro comparativo: estrategias de control de patógenos e inmunoestimulación.....	12
Tabla 2. Aislamiento de BAL de pingüinos en el territorio Antártico.....	16
Tabla 3. Cuantificación de colonias viables (log UFC/ml) para cepas lácticas sometidas a distintos pH.....	23
Tabla 4. Cuantificación de colonias viables (log UFC/ml) para cepas lácticas sometidas a distintas concentraciones de sales biliares.....	26
Tabla 5. Actividad antimicrobiana de los aislados de bacterias ácido lácticas contra <i>S. enterica</i> ATCC 13076, <i>E. coli</i> ATCC 25922 y <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	29
En el Apéndice	Página
Tabla A1. Crecimiento (DO A _{500nm}) de las cepas lácticas a diferentes concentraciones de pH en caldo MRS, a las 24 horas.....	56
Tabla A2. Crecimiento (DO A _{500nm}) de las cepas lácticas a diferentes concentraciones de sales biliares (% p/v) en caldo MRS, a las 24 horas.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Relación de factores extrínsecos en la alteración del sistema inmunológico en pingüinos antárticos.....	14
Figura 2. Capacidad de resistencia de las cepas lácticas a diferentes concentraciones de pH en caldo MRS (DO _{500nm}), a las 24 horas.....	22
Figura 3. Capacidad de resistencia de las cepas lácticas a diferentes concentraciones de sales biliares en caldo MRS (DO _{500nm}), a las 24 horas.....	25
Figura 4. Comportamiento de la hidrofobicidad de las cepas lácticas en xileno.....	28
En el Apéndice	Página
Figura A1. Registro actividad antimicrobiana de 3 cepas lácticas a) 28.1, b) 28.2, c) 31.1, d) 47.1 y e) 47.2 frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	58

ÍNDICE DE ECUACIONES

	Página
Ecuación 1. Porcentaje de resistencia.....	18
Ecuación 2. Porcentaje de hidrofobicidad.....	19

ANÁLISIS DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN PINGÜINOS ANTÁRTICOS: UN ENFOQUE HACIA LA PRESERVACIÓN

ANALYSIS OF THE PROBIOTIC POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA
IN ANTARCTIC PENGUINS: AN APPROACH TO PRESERVATION

Palabras claves: *in vitro*, sistema inmunológico, patógenos.

RESUMEN

En la actualidad los pingüinos antárticos son reservorios de microorganismos patógenos asociados a enfermedades infecciosas en humanos. Debido al aislamiento geográfico los pingüinos presentan una susceptibilidad inmunológica al ingreso de nuevos patógenos de otras partes del mundo. Bajo este escenario, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad probiótica *in vitro* de las bacterias ácido láctico (BAL) aisladas de pingüinos antárticos. Para ello se realizaron pruebas para determinar la capacidad de las BAL de sobrevivir y adherirse al sistema gastrointestinal del ave, además de evaluar la actividad antimicrobiana de las cepas lácticas. Los resultados mostraron que las cepas lácticas fueron capaces de soportar en caldo MRS valores de pH sobre 4, sin embargo, por medio de UFC/ml se observaron 5 cepas capaces de resistir a pH 3. Por otra parte, todas las BAL resistieron positivamente las concentraciones de sales biliares que van desde 0,1 % a 1%. La capacidad de adherirse al intestino del animal fue evaluada a través del porcentaje de hidrofobicidad, donde los valores variaron entre 0% a 77,14%. De las 11 cepas

lácticas sólo dos (28 y 31) generaron halo de inhibición ante el patógeno *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se concluye que las cepas lácticas aisladas en pingüinos fueron resistentes a condiciones de crecimiento desfavorables de pH y sales biliares establecidos, además de presentar buenos resultados a su capacidad de adherirse a un hidrocarburo. A pesar de no inhibir a dos de los tres patógenos de prueba, los resultados frente a *S. aureus* indicarían que las BAL poseen propiedades probióticas, y junto a ello ser un potencial biorremediador frente a las futuras condiciones de salud en pingüinos antárticos.

ANALYSIS OF THE PROBIOTIC POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA IN ANTARCTIC PENGUINS: AN APPROACH TO PRESERVATION

Keywords: Pathogens, *in vitro*, immune system.

SUMMARY

Antarctic penguins are currently reservoirs of pathogenic microorganisms associated with infectious diseases in humans. Due to geographical isolation, penguins have an immunological susceptibility to the entry of new pathogens from other parts of the world. Under this scenario, the objective of this work is to evaluate the probiotic capacity *in vitro* of lactic acid bacteria (LABs) isolated from Antarctic penguins. To do this, tests were carried out to determine the ability of the LABs to survive and adhere to the gastrointestinal system of the bird, in addition to evaluating the antimicrobial activity of the lactic strains. The results showed that the lactic strains were able to withstand in MRS broth pH values over 4, however, by means of CFU/ml 5 strains capable of resisting pH 3 were observed. On the other hand, all LABs positively resisted bile salt concentrations ranging from 0.1% to 1%. The ability to adhere to the animal's intestine was evaluated through the percentage of hydrophobicity, where the values ranged from 0% to 77.14%. Of the 11 lactic strains, only two (28 and 31) generated an inhibition halo against the pathogen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. It is concluded that the lactic strains isolated in penguins were resistant to unfavorable growth conditions of pH and established bile salts, in

addition to presenting good results to their ability to adhere to a hydrocarbon. Despite not inhibiting two of the three test pathogens, the results against *S. aureus* would indicate that BALs possess probiotic properties, and together with this be a potential bioremediator against future health conditions in antarctic penguins.

1. INTRODUCCIÓN

La Antártida se caracteriza por ser un territorio inhóspito y frío, con una permanente capa de hielo, capaz de reflejar el 90% de la radiación solar recibida, asimismo, ser una fuente de aire frío, que alcanza la forma de fuertes vientos casi constantes (sobre 100 km/h) que descienden hacia la costa. Junto a ello, la temperatura media bordea entre los -49 °C en la mayor parte del continente y cercano a la costa, los valores oscilan entre 8 a -30 °C (INACH, 2006).

A pesar de las extremas condiciones para la vida, existe una rica diversidad biológica, capaz de adaptarse y sobrevivir, en base a los recursos otorgados por el territorio Antártico. Esta biodiversidad va desde lo más microscópico, como bacterias y microorganismos que cumplen tareas vitales para el reciclaje de nutrientes y la mantención de ecosistemas (INACH, 2021), hasta organismos visibles al ojo humano.

En la antártica, es posible encontrar flora tanto terrestre como acuática, donde destacan especies vasculares como *Deschampsia antarctica* y *Colobanthus quitensis* capaces de soportar las duras condiciones del lugar, junto con una gran variedad de algas, tanto marinas como continentales (INACH, 2021; Marcías *et al.*, 2017).

Por otro lado, la fauna antártica se conforma por la presencia de peces, zooplancton, cetáceos y mamíferos marinos que además de estar en el agua, realizan ciertas actividades en la tierra. Pero gran parte de esta fauna está compuesta principalmente por aves (Arriata, 2019; INACH, 2006). Dentro de

esta última categoría, se encuentra un grupo de aves primitivas que residen permanentemente en el continente, los pingüinos. De las 18 especies conocidas de pingüinos, sólo 6 viven en la Antártica e islas subantárticas (Adelia, Emperador, Barbijo, Papúa, Macaroni y Rey), y de ellas, sólo dos son endémicas del lugar (Adelia y Emperador) (Barbosa, 2018).

En el continente blanco, los pingüinos presentan un papel de intercambiador de nutrientes entre los sistemas terrestres y marinos (De La Peña-Lastra, 2021). Estas aves pasan la mayor parte de su vida en el mar o sus alrededores, solo en épocas de reproducción congregan en grandes colonias en las zonas costeras de la Antártica continental y marítima (INACH, 2006). Este continuo traslado deja huella en la tierra en forma de extensos depósitos de guano, plumas, huevos, cadáveres que producen los llamados suelos ornitogénicos, ricos en carbono orgánico, nitrógeno, fósforo y materia orgánica (Almela *et al.*, 2022; Chu *et al.*, 2019; Tatur, 1989).

La gran cantidad de nutrientes proporcionados por el guano del pingüino, ocasionan beneficios a diferentes organismos del ecosistema antártico, como es en el caso de las bacterias, donde la abundancia y diversidad se ven aumentados en suelos ornitogénicos, en comparación, a suelos mineralizados que están dominados por pocos filos y baja diversidad bacteriana (Almela *et al.*, 2022; Guo *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019).

Otro beneficio, se puede ejemplificar con la actividad reproductiva del pingüino Adelia en la costa occidental de la Isla Rey Jorge, donde a fines de enero, mientras los polluelos aún son alimentados por los padres, se emite un fuerte

olor producido principalmente por vapor de amoníaco que deriva de la amonificación del ácido úrico presente en los depósitos de guano. Este fenómeno se denomina “sombra de amoníaco” que es responsable del crecimiento de comunidades de pasto antártico (*Deschampsia antártica*), alga (*Prasiola crispa*) y líquenes endémicos (*Caloplaca* y *Xanthoria*) (Grzesiak *et al.*, 2020; Otero *et al.*, 2018; Tatur *et al.*, 1997).

En relación al estado de conservación de las especies restringidas a la Antártica y regiones subantárticas, el pingüino Emperador está catalogado en la Lista Roja de la Unión Internacional para la conservación de la Naturaleza (UICN) del 2020 como casi amenazada con la justificación de que, en los próximos años, mediante proyecciones, se producirá una disminución entre el 20-29% de parejas reproductoras, en cambio, los pingüinos Adelia, Barbijo y Papúa están clasificados como menor preocupación, a causa de un aumento en sus poblaciones (BirdLife International, 2020a; 2020b; 2020c; 2020d).

A pesar del aumento, ciertos grupos de pingüinos Barbijos ubicados en la Península Antártica, manifiestan un descenso en la población en los últimos 50 años (Strycker *et al.*, 2020). Además, se espera por medio de modelaciones en base al cambio climático, una disminución de la población de Adelia al norte del continente Antártico (BirdLife International, 2020a).

El cambio climático jugará un rol en la abundancia de las poblaciones de pingüinos del territorio blanco en los próximos años (Hinke *et al.*, 2017), por medio variaciones en la temperatura media global, disminución en la masa de hielo antártico y eventos ambientales anómalos (IPPC, 2019), de manera que

los cambios modificarán el hábitat, y los recursos alimentarios de estas especies. En el caso del pingüino Adelia una modificación en la extensión, formación y persistencia del hielo marino costero ocasionará impactos negativos en la población, pues sus actividades de reproducción, crianza y recolección de alimentos dependen de un rango óptimo de cobertura de hielo fijo (Barreau *et al.*, 2019; Che-Castaldo *et al.*, 2017; Constable *et al.*, 2014).

El hielo marino no solamente es importante para el éxito reproductivo, sino también en los recursos alimenticios. Durante el invierno los témpanos de hielo son un lugar de alimentación importante para las larvas del krill Antártico cuya productividad de la columna de agua está limitada por la luz, presentando una correlación de la abundancia del krill con la extensión del hielo marino en invierno (Flores *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, 2017). Tanto el pingüino Emperador, Adelia, Barbijo como también Papúa se sitúan en los niveles tróficos superiores, depredando al Krill además de otros organismos (Marina *et al.*, 2020).

A pesar de los efectos negativos sobre las especies de pingüinos antárticos y subantárticos, los pingüinos de Papúa han presentado una respuesta favorable con relación a la variabilidad climática, al presentar estrategias de alimentación diversa y preferencias de hábitat de reproducción en lugares donde ha existido disminución en la extensión del hielo marino (Herman *et al.*, 2020; Hinke *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2009).

La existencia de factores que alteran los ecosistemas antárticos puede limitar la búsqueda adecuada de hábitat y alimento, para las actividades de

reproducción, muda y alimentación, propiciando así una demanda energética adicional, limitando otras funciones fisiológicas sustanciales como el sistema inmunológico (Barbosa, 2011; Di Fonzo y Ansaldo, 2022). De acuerdo con el principio de asignación, la energía que obtiene un organismo debe ser repartidos entre los requerimientos de mantención, crecimiento y reproducción. Un incremento en la cantidad energía otorgada a uno de los requerimientos afectará a las demás funciones fisiológicas (Carranza, 1994; Smith y Smith, 2007). Por ende, las limitaciones en alimento, la demanda energética durante la reproducción y muda, son reactores de una respuesta estresante en pingüinos, el cual propicia una situación de compromiso en el sistema inmunológico en función de la demanda energética necesaria para satisfacer las distintas necesidades (Barbosa, 2011; D'amico *et al*, 2016).

Frente a las proyecciones del cambio climático en la Antártica y la asignación de energía tras una alteración del medio, pueden ocasionar, que el pingüino sea un blanco idóneo para nuevos agentes infecciosos (Grimaldi *et al.*, 2015). En los últimos años se han descubierto patógenos que afectan a las diferentes especies de pingüinos, debido, a que las especies antárticas presentan una cierta debilidad inmunológica que las hacen vulnerables a los patógenos de otras partes del mundo (Dobson y Foufopoulos, 2001). Entre los hallazgos está el virus de la influenza aviar (Barriga *et al.*, 2016), avulavirus aviares (Wille *et al.*, 2019) y picornavirus (De Souza *et al*, 2019), además aislamientos bacterianos de la especie *Campylobacter* spp. (Johansson *et al.*, 2018), *Salmonella* (Retamal *et al.*, 2017) y *Escherichia coli* (González-Acuña *et al.*,

2013). A la fecha, ningún estudio ha podido establecer si los virus o bacterias ya mencionados, ocasionan enfermedad o mortalidad en pingüinos.

Estos patógenos están asociados a la mortalidad de aves y a la posibilidad de infectar humanos. Por ello, la introducción de patógenos a la fauna silvestre puede relacionarse a dos fuentes principales, especies migratorias que se desplazan año a año desde la Antártida a otras áreas del planeta (García-Peña *et al.*, 2017); o a través de la actividad humana en el continente (Bonnedahl *et al.*, 2005).

La relación entre el ingreso de nuevos organismos patógenos por la creciente actividad antropogénica en la Antártica se le puede añadir organismos resistentes a antibióticos. Algunos estudios han encontrados bacterias resistentes a antibióticos utilizados en medicina humana y animal, en muestras de agua y especies de pingüinos antárticos en zonas influenciadas por humanos y vida silvestre, como es la Península Antártica (Hernández *et al.*, 2018; Jara *et al.*, 2020; Rahman *et al.*, 2015).

A causa de estos escenarios, se hace necesario analizar posibles soluciones que permitan sobrellevar la actual y futura condición de estas aves marinas, las cuales juegan un rol importante en el ecosistema Antártico. Por ello, una manera de anticipar la respuesta a posibles infecciones, considerando además la resistencia en antibióticos registradas en el continente blanco, es la utilización de nuevas alternativas de control, como son el uso de extractos de plantas, microorganismos vivos o sustancias orgánicas con propiedades antimicrobianas (Hume, 2011). Entre los métodos se pueden señalar los

prebióticos, probióticos, aceites esenciales, bacteriófagos, entre otros. A pesar de cumplir con el mismo objetivo respecto a mejorar la salud del animal, las propiedades y mecanismos de acción en el organismo varían (Tabla 1).

La literatura relacionada a las estrategias de control de microorganismos patógenos, se basan en mejorar la salud intestinal del animal y en el caso de los animales de cultivos intensivos proporcionar alimentos seguros para el consumo humano (Jerzsele *et al.*, 2012; Kahn *et al.*, 2019; Zoumpopoulou *et al.*, 2018). No obstante, existen investigaciones en el uso de probióticos en animales silvestres para la mitigación de patógenos (Alberoni *et al.*, 2016; Hoyt *et al.*, 2015; Lam *et al.*, 2011).

En vista de las diferentes estrategias de control ya presentadas (Tabla 1), la utilización de cepas probióticas se puede considerar como una manera óptima de afrontar dificultades en el funcionamiento correcto del sistema inmunológico en pingüinos ante el ingreso de patógenos invasores, pues los organismos vivos utilizados como probióticos ya se encuentran en interacción con el individuo sin originar un efecto adverso en su salud (McKenzie *et al.*, 2018). Son capaces de otorgar beneficios en el microbiota intestinal y a la par, reforzar el sistema inmunológico del individuo (Anadón *et al.*, 2019).

En cuanto a los agentes probióticos, estos pueden variar desde mohos (*Aspergillus*) y levaduras (*Saccharomyces*) hasta bacterias (Amara y Shibl, 2015), donde la fuente más grande y mejor caracterizada son los miembros de

Tabla 1. Cuadro comparativo: estrategias de control de patógenos e inmunoestimulación.

Estrategia	Prebiótico	Probiótico	Aceites esenciales	Bacteriófago
Componente	Compuesto orgánico	Microorganismo vivo	Materia vegetal	Virus
Propiedad	Favorece al desarrollo de microorganismos intestinales	Mejora barrera intestinal - Estimula respuesta inmune gastrointestinal	Antiviral, antiparasitaria, antimicrobiana	Antimicrobiano
Modo de acción	Induce procesos metabólicos en bacterias beneficiosas del intestino grueso	Adhesión al tracto digestivo	Inhibición directa a patógenos	Inhibición directa a patógenos
Especificaciones	Debe ser resistentes a los procesos digestivos Dosis inadecuada puede alterar la microbiota intestinal	Deben ser aislados del individuo perteneciente a la especie a tratar Especies ajenas pueden producir resistencia a antibióticos, endotoxinas y toxinas	No es específico atacando a organismos Pueden disminuir la cantidad de linfocitos El olor y/o sabor puede ser rechazado por el animal	Existen bacterias resistentes a fagos Hay fagos estrictamente virulentos
Modo de aplicación	Alimento	Alimento	Alimento	Oral Intramuscular Superficial

Elaboración propia a partir de información de Ambrosio *et al.*, 2017; Frampton *et al.*, 2012; Markowiak y Ślizewska, 2018; Omonijo *et al.*, 2018; Patel *et al.*, 2015.

las bacterias ácido láctico (BAL). Las BAL son componentes naturales de la microbiota intestinal normal tanto en humanos como en animales (Frizzo *et al.*, 2018), se reconocen como cocos o bacilos Gram positivos, no esporulantes, productores de ácido láctico (Holzapfel *et al.*, 2001), además de poseer la capacidad de resistir a condiciones desfavorables del organismo del animal (Ringø *et al.*, 2018). Cabe destacar las BAL son consideradas generalmente seguras (GRAS) por la Agencia Europea De Seguridad Alimentaria (EFSA) lo cual significa que no son patógenas y su aplicación es segura para humanos y animales (Szatraj *et al.*, 2017).

Como resultado de los efectos del cambio climático y la actividad antropogénica sobre los pingüinos (Figura 1), y tomando en cuenta los beneficios de los probióticos en la microbiota intestinal del animal, es que en este trabajo se propone evaluar el potencial benéfico *in vitro* de cepas BAL aisladas en pingüinos antárticos.

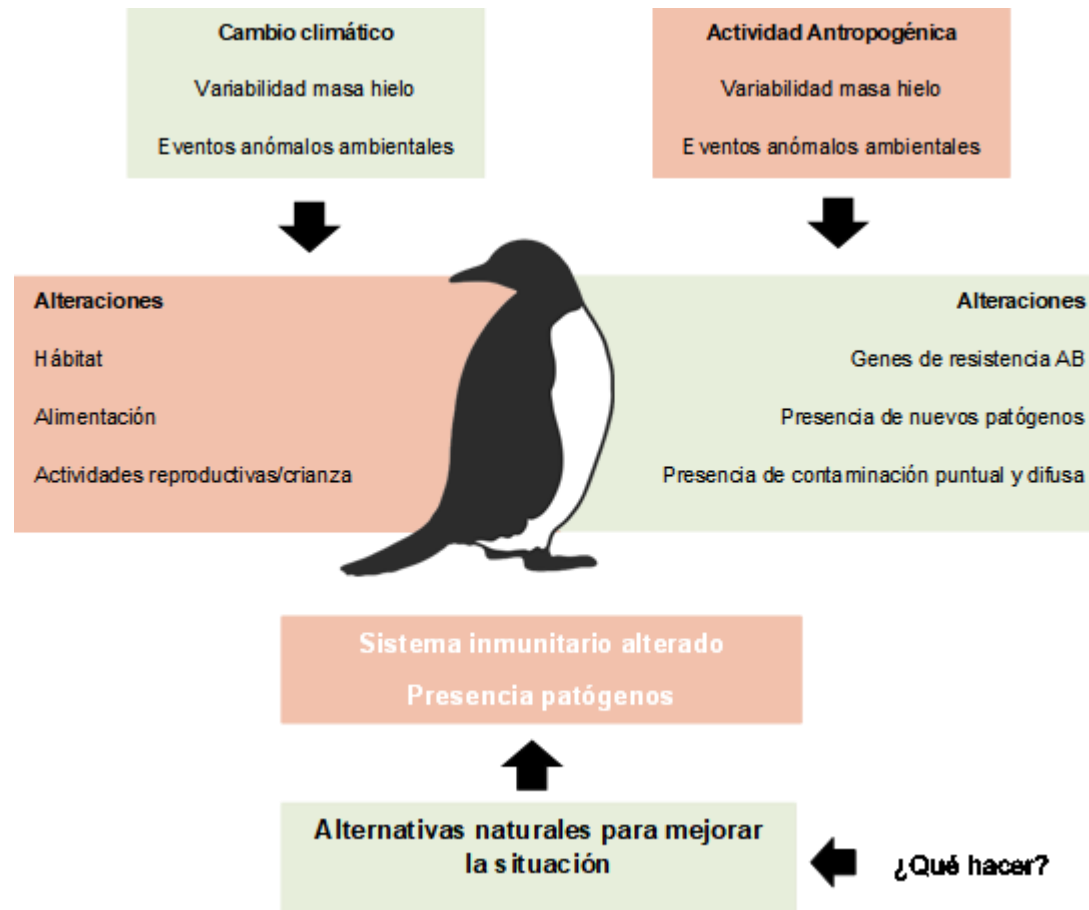


Figura 1. Relación de factores extrínsecos en la alteración del sistema inmunológico en pingüinos antárticos
Fuente: Elaboración propia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad probiótica *in vitro* de las BAL aisladas en pingüinos antárticos.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar algunas propiedades funcionales de las cepas aisladas, que les brinden potenciales aptitudes probióticas.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas contra patógenos.

3. METODOLOGÍA

3.1. Muestras de origen antártico

Las muestras de pingüinos de las cuales se obtuvieron los aislamientos de bacterias ácido lácticas (BAL) (Tabla 2) proceden de la Isla Ardley en el continente Antártico, en el contexto del proyecto del Instituto Antártico Chileno (INACH) RT4217.

Para su traslado al laboratorio, el pellet microbiano se centrifugó y conservó en tubos Eppendorf con leche extracto levadura (LEL) a -20°C (Landa-Salgado *et al.*, 2019).

Tabla 2. Aislamiento de BAL de pingüinos en el territorio Antártico.

N° cepa	Origen
19	Adelia – polluelo - cloacal
22	Adelia – polluelo - ala
23	Papúa – polluelo - cloacal
26	Adelia – adulto - oral
28	Barbijo – polluelo - oral
29	Adelia – polluelo - oral
30	Barbijo – adulto - oral
31	Barbijo – polluelo - ala
32	Barbijo – polluelo - ala
33	Papúa – adulto - cloacal
34	Adelia – polluelo - cloacal

3.2. Inoculación y condiciones generales de crecimiento

A partir de los aislamientos bacterianos guardados a -20°C , se inocularon 100 μl de cada cepa en tubos con 4 ml de caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe) a 30°C durante 24 horas. Una vez pasado el tiempo se realizó un segundo sembrado bajo las mismas condiciones por otras 24 horas. Posterior a este proceso las cepas fueron centrifugadas a 9500 rpm a 8°C por 10 min, lavado dos veces con suero fisiológico 0,9% para eliminar el sobrenadante y luego ajustarlo a una absorbancia entre 0,5 a 0,599 ($\text{DO}_{500\text{nm}}$ - $\text{DO}_{620\text{nm}}$) (Jurado-Gómez *et al.*, 2014).

3.3. Selección de cepas BAL con potencial probiótico *in vitro*

Se utilizaron 11 cepas lácticas aisladas en pingüinos antárticos para la realización de ensayos frente a condiciones de estrés, colonización y actividad antimicrobiana. Como control se empleó una BAL, correspondiente a la especie *Lactobacillus plantarum*, que ha sido ampliamente estudiada para la producción de probióticos (Cermeño, 2012; Jurado-Gómez *et al.*, 2021).

3.3.1. Tolerancia al cambio de pH

Las cepas fueron cultivadas en caldo Mann Rogosa Sharp (MRS) ajustado a un rango de pH (3, 4, 5 y 6) mediante NaOH y HCl a 1M (Montes, 2005). Se incubaron a 38°C durante 24 horas (se consideró la temperatura corporal promedio del pingüino (Thouzeau *et al.*, 2003)). Finalizado el tiempo se determinó la resistencia de las BAL a las concentraciones señaladas a través

de una DO_{500nm} y calculando el porcentaje de resistencia (Paitán *et al.*, 2019) por medio de la ecuación:

$$\% \text{ Resistencia} = (\text{Absorbancia } N_1 / \text{Absorbancia } N_0) \times 100 \quad [1]$$

N₁: Lectura DO después del tratamiento

N₀: Lectura DO sin el tratamiento

Además, se comprobó la resistencia de las cepas mediante la determinación del número de células viables (UFC/ml) después de 24 horas de incubación a 38°C para cepas sin tratamiento y con tratamiento (Gómez *et al.*, 1998).

3.3.2. Resistencia en presencia de sales biliares

Se cultivaron las cepas en caldo MRS que contenían bilis deshidratada (OXGALL BBL®) en concentraciones de 0,1 – 0,3 – 0,5 – 1% p/v. Fueron incubadas a 38°C por 24 horas (Ávila *et al.*, 2010). Tanto la resistencia de las cepas BAL y la determinación de la UFC, se determinó mediante el mismo procedimiento utilizado en la prueba de pH.

3.3.3. Hidrofobicidad de la superficie celular

La capacidad de las cepas BAL para adherirse al tracto gastrointestinal se identificó según el método de partición en solvente orgánico MATH (Microbial Adhesion to Hydrocarbon) descrito por Rosenberg *et al.* (1983) con algunas modificaciones. Las cepas cultivadas en MRS por 24 horas se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos para luego ser resuspendidas en 500 µl de tampón PUM. La suspensión bacteriana se ajustó con una absorbancia entre 0,2 a 0,4 con una densidad óptica leída a 400nm. A continuación, se mezcló con 300 µl

de xileno y se agitó en el vortex por 2 minutos. La mezcla se dejó reposar por 10 minutos para observar la separación de fase (fase orgánica y fase acuosa). Los resultados se expresaron como la densidad óptica leída entre 400nm y 600nm de la fase acuosa. Se estimó el porcentaje de hidrofobicidad (%H) como:

$$\%H: [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad [2]$$

A₀: DO antes de la extracción del hidrocarburo

A₁: DO después de la extracción del hidrocarburo

Para esta prueba se consideró las siguientes categorías de hidrofobicidad. Fuertemente hidrofóbica valores > 71%, medianamente hidrofóbicas entre 36 – 70% e hidrofílicas < 35% (Ocaña *et al.*, 1999).

3.3.4. Actividad antimicrobiana

La actividad antibacteriana de las cepas lácticas ante patógenos se llevó a cabo sobre la base del método de difusión en pozos de agar descrita por Balouiri *et al.* (2016) con modificaciones. Los patógenos de prueba utilizados fueron *Samonella enterica* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ajustados a 0.5 unidades según escala de Mc Farland. En cuanto a las bacterias lácticas se usaron en forma de pellet, sobrenadante y cultivo total.

En la superficie de la placa de agar Mueller-Hinton, se dispersó por medio de una tórula de madera estéril el inóculo de los microorganismos patógenos en cada placa por duplicado. Seguidamente, se perforó asépticamente 5 agujeros con un diámetro de 6 mm para construir los pocillos. Los pocillos fueron

identificados como: (1) pellet, (2) sobrenadante, (3) cultivo total, (4) caldo MRS y (5) suero (últimos dos como control). Una vez realizado la perforación, se introdujo en el pozo un volumen de 100 μ L de BAL en el formato indicado anteriormente, además de los controles. Finalmente, se incubó a 24 horas en condiciones de aerobiosis.

La valoración de los resultados se interpretó mediante el diámetro de una zona clara de inhibición (mm) alrededor del pozo. Los valores finales de los diámetros de inhibición formados por el efecto de la actividad antibacteriana de las BAL se obtuvieron restando el tamaño del pozo (6 mm) a la zona de inhibición obtenida (García *et al.*, 2017). Posteriormente se clasificaron a través del criterio de Gaudana *et al.* (2010), donde diámetros menores a 1 mm se consideran sin inhibición, diámetros mayores a 1 mm hasta 2 mm como inhibición leve, diámetros más de 2 mm hasta 5 mm inhibición fuerte y, por último, diámetros superiores a 5 mm inhibición muy fuerte.

3.4. Análisis estadístico

Para los datos en duplicado, obtenidos en las pruebas de tolerancia al cambio de pH y resistencia a sales biliares (SB) se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) en el programa estadístico INFOSTAT® versión 2008 (Balzarini *et al.*, 2008). Al presenciar diferencias significativas ($p < 0,05$) se aplicó prueba de Tukey para realizar una comparación múltiple entre las medias.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Tolerancia al cambio de pH

Introducir como criterio de selección la resistencia en un intervalo entre pH 3 a 6, nos permite detectar los microorganismos capaces de resistir a condiciones extremas de acidez, puesto que, el primer compartimiento en enfrentar, en un tiempo considerable, es el estómago del pingüino. Donde el pH estomacal en aves que conservan el alimento varía entre 3,5 a 6,2, y al momento de digerir el alimento entre 1,9 a 4,4 (Thouzeau *et al.*, 2003).

De la Figura 2, las 12 cepas evaluadas durante 24 horas de exposición no presentaron crecimiento a pH3. En cambio, a pH4 sólo la cepa 34 soportó las condiciones ácidas del medio, adicionalmente presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) frente a la cepa control *Lactobacillus plantarum* (cepa 47), mostrando una disminución del 56,65% de la capacidad de resistencia en comparación a la cepa 47. A medida que el pH aumenta, se observó un incremento en los valores de resistencia para todas las cepas.

Al comprobar la resistencia de las cepas a condiciones ácidas mediante la determinación Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Tabla 3) no se evidencia crecimiento a pH3 para las cepas 19, 22, 23, 26 28 y 32; sin embargo, las cepas 29, 30, 31, 33 y 34 permanecieron viables después de 48 h de incubación. A medida que la concentración incrementa se observa un aumento en los recuentos bacterianos.

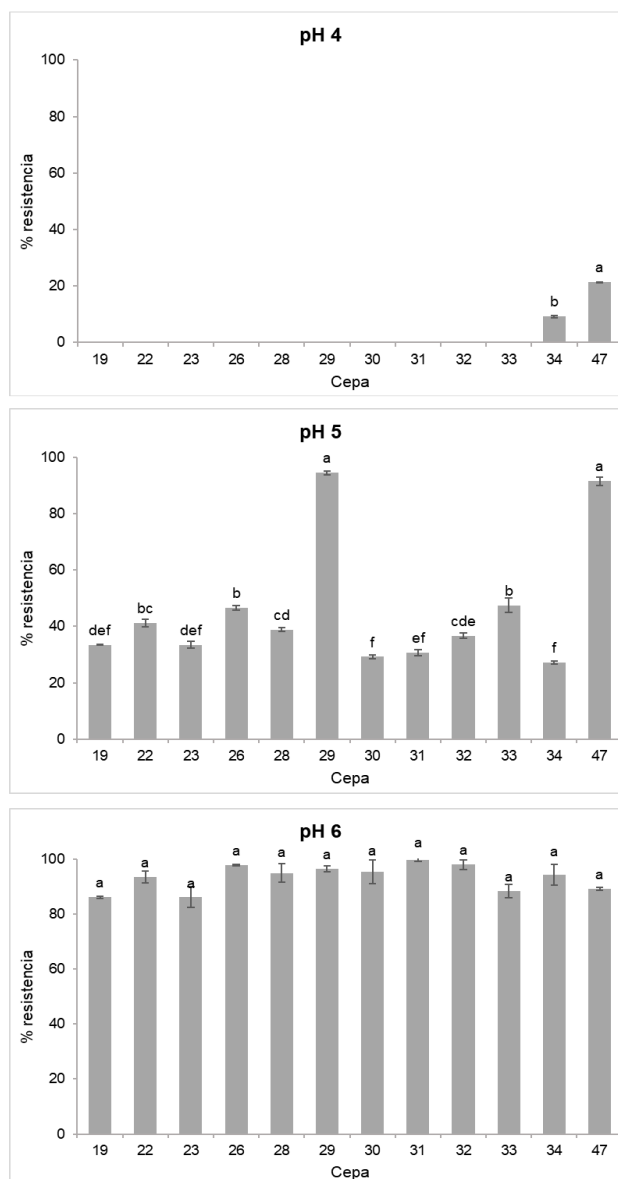


Figura 2. Capacidad de resistencia de las cepas lácticas a diferentes concentraciones de pH en caldo MRS (DO_{500nm}), a las 24 horas. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Cada concentración de pH es una prueba independiente.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3. Cuantificación de colonias viables (UFC/ml) para cepas lácticas sometidas a distintos pH.

Cepa	0 h	48 h			
		pH 3	pH 4	pH 5	pH 6
Experimental					
19	1,65E+08	SC	7,25E+05	4,73E+08	8,50E+08
22	6,00E+07	SC	5,75E+05	2,90E+08	9,25E+08
23	6,25E+07	SC	6,60E+05	3,05E+08	1,45E+09
26	8,00E+07	SC	1,65E+05	1,65E+08	1,65E+08
28	1,20E+08	SC	2,85E+05	2,48E+08	2,48E+08
29	1,40E+08	6,00E+02	4,35E+05	2,08E+08	2,08E+08
30	6,50E+07	5,00E+01	7,33E+05	3,78E+08	3,78E+08
31	8,00E+07	5,00E+01	7,45E+05	3,83E+08	3,83E+08
32	4,25E+07	SC	5,15E+05	3,10E+08	3,10E+08
33	1,63E+08	5,00E+01	7,03E+05	5,40E+08	1,05E+09
34	1,03E+08	1,45E+03	1,13E+06	3,73E+08	1,20E+09
Control					
47	1,04E+08	3,81E+02	2,93E+08	1,24E+09	2,04E+09

Fuente: Elaboración propia.

Nota: SC: Sin crecimiento.

Estos resultados han sido observados en bacterias lácticas obtenidas de estiércol de terneros (Castillo *et al.*, 2018), heces de *Gallus gallus* (Lara y Burgos, 2012) y heces cebú (Bertel *et al.*, 2019) donde se evidenció poco crecimiento en pH menores a 4 y un incremento significativo en pH mayores a 5, considerando un tiempo prolongado de exposición.

Para esta baja resistencia a pH menor a 4 de las cepas observadas, podría considerarse como un obstáculo para llevar a cabo un probiótico en pingüinos, pero una adecuada elección de un transporte para la administración, lograría protegerlo de las condiciones adversas del sistema digestivo de las aves (Lee *et al.*, 2003).

4.2. Resistencia en presencia de sales biliares

De acuerdo con la autora Caballero (2014), las sales biliares (SB) se consideran una barrera antibacteriana crucial ante el asentamiento de las bacterias probióticas en el organismo del individuo, por ende, se tiene en cuenta como requisito en la selección de bacterias probióticas.

Para esta investigación las concentraciones de SB (0,1% - 0,3% – 0,5% – 1%) están en base a diferentes trabajos enfocados en la evaluación probiótica de BAL para uso animal (Castillo *et al.*, 2018; Pozos, 2018; Vélez y Menéndez, 2018), debido a que se desconoce las concentraciones para una gran variedad de animales (Sánchez *et al.*, 2015), incluyendo los pingüinos.

Los resultados a partir de la densidad óptica y UFC (Figura 3 y Tabla 4) mostraron un buen desarrollo en presencia de SB para todos los valores, con una reducida variación a medida que la concentración aumenta. Para esta prueba se destaca que en todas las cepas evaluadas a 1% presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a la cepa control, demostrando mejores condiciones respecto a esta concentración. Para esta diferencia se reporta que la resistencia a las sales cambia entre bacterias ácido lácticas y cepas de la misma especie (Ávila *et al.*, 2010).

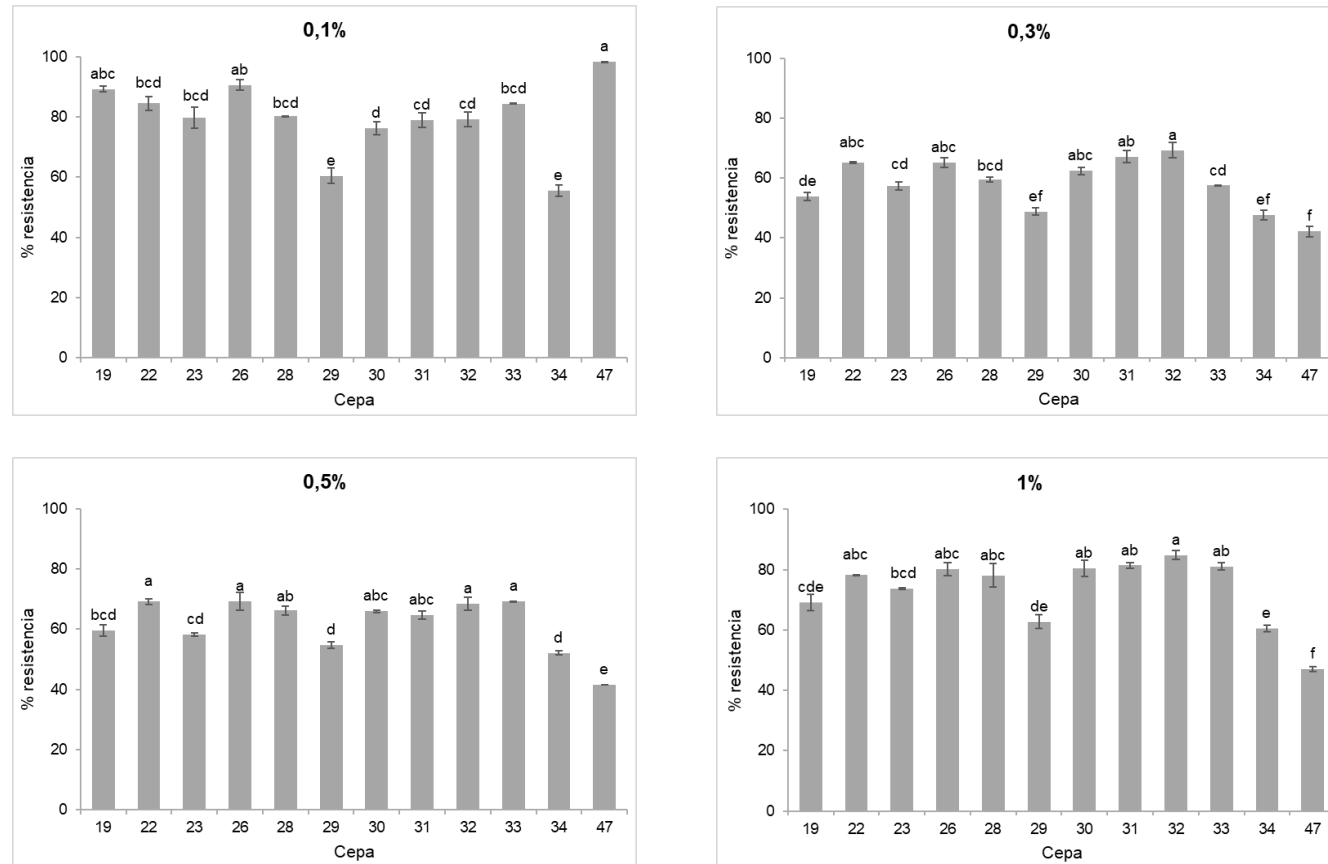


Figura 3. Capacidad de resistencia de las cepas lácticas a diferentes concentraciones de sales biliares en caldo MRS (DO_{500nm}), a las 24 horas. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Cada concentración de sales biliares es una prueba independiente. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Cuantificación de colonias viables (UFC/ml) para cepas lácticas sometidas a distintas concentraciones de sales biliares.

Cepa	0 h	48 h			
		0,1%	0,3%	0,5%	1%
Experimental					
19	9,50E+07	4,93E+08	1,20E+08	5,25E+07	2,65E+07
22	8,00E+07	3,33E+08	1,35E+08	6,83E+07	2,28E+07
23	9,75E+07	3,00E+08	1,23E+08	7,05E+07	2,83E+07
26	8,50E+07	3,58E+08	1,18E+08	7,20E+07	3,10E+07
28	7,25E+07	3,48E+08	1,33E+08	6,98E+07	2,08E+07
29	6,25E+07	4,48E+08	1,88E+08	5,50E+07	2,85E+07
30	6,50E+07	6,73E+08	1,60E+08	6,90E+07	4,60E+07
31	1,10E+08	6,78E+08	1,80E+08	7,48E+07	2,90E+07
32	8,00E+07	7,13E+08	1,48E+08	7,45E+07	4,28E+07
33	9,50E+07	3,18E+08	1,18E+08	6,88E+07	4,23E+07
34	8,75E+07	4,60E+08	1,55E+08	7,15E+07	4,95E+07
Control					
47	3,88E+07	2,99E+08	1,06E+08	8,38E+07	7,88E+07

Fuente: Elaboración propia.

El crecimiento de las BAL en este estudio coincide con los referidos por Caballero (2014) donde un total de 14 cepas lácticas aisladas de bovinos fueron capaces de sobrevivir a concentración de 0,3% a 1,5% de SB. De la misma manera, *L. plantarum* extraída de heces de caballos demostró resistencia a 0,5% de SB (Khusro *et al.*, 2021). Esta tolerancia a SB puede ser ocasionado por la producción de enzima sal biliar hidrolasa (SBH) que han manifestado algunos géneros de *Lactobacillus* (Horackova *et al.*, 2020), *Bifidobacterium* (Kim y Lee, 2008) y *Enterococcus* (Knarreborg *et al.*, 2002), la cual es capaz de catalizar la hidrólisis de sales biliares para usarla como fuente

de energía o incorporar a su membrana para aumentar sus defensas contra agentes nocivos (Corzo y Gilliland, 1999).

4.3. Hidrofobicidad de la superficie celular

La habilidad de adherirse a las paredes del intestino de un organismo es esencial al momento de seleccionar un microorganismo probiótico (Tarique *et al.*, 2022), pues, disuade la inmediata eliminación por los movimientos peristálticos del animal, además de proporcionar una ventaja competitiva frente a patógenos en el ecosistema intestinal (Kos *et al.*, 2003).

Para esta evaluación se reveló que la capacidad de adhesión de los aislados de BAL presentaron una variación entre 0% a 77,14% (Figura 4). En el cual, sólo las cepas 22 (73,67%) y 29 (73,67%) manifestaron una alta afinidad al hidrocarburo, respecto a la categoría definida anteriormente. No obstante, el resto de las cepas obtuvieron valores sobre el 60% e inclusive mayores porcentajes en comparación a la cepa control (51,47%). De las 12 cepas analizadas, únicamente la cepa 32 presentó carácter hidrofílico ante el xileno. Esta disparidad en la afinidad al hidrocarburo se puede asociar a los componentes principales de la pared celular de las cepas, donde bacterias con abundantes ácidos lipoteicoicos vuelven la superficie más hidrofóbica, en contraste, con microorganismos hidrofílicos que presentan un elevado contenido de polisacáridos (Schär-Zammaretti y Ubbink, 2003).

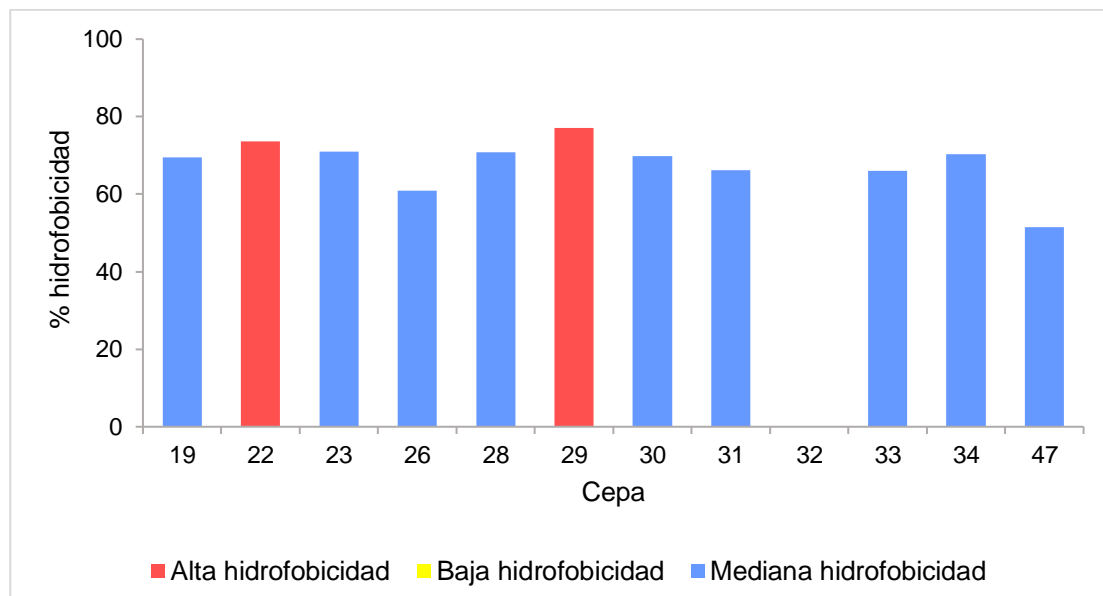


Figura 4. Comportamiento de la hidrofobicidad de las cepas lácticas en xileno. Fuente: Elaboración propia.

Uno de los tantos mecanismos de acción que se le puede atribuir a un probiótico es el efecto competitivo con otros microorganismos, estableciéndose en los potenciales sitios de ocupación (células epiteliales del intestino) de bacterias patógenas (Tormo, 2006). Desde esta perspectiva, Palachum *et al.* (2018) señalan que comparar la hidrofobicidad de bacterias patógenas con valores de las cepas evaluadas es de gran interés, en vista que los patógenos se adhieren a las células epiteliales para iniciar la infección. Para patógenos aislados en pingüinos antárticos (González-Acuña *et al.*, 2013; Johansson *et al.*, 2018 Retamal *et al.*, 2017) los porcentajes de hidrofobicidad fluctúan entre 9% a 23% para especies de *Salmonella* (Beshiru *et al.*, 2018), 22% a 26% en aislados de *Escherichia coli* (Yilmaz y Güvensen, 2016) y *Campylobacter* spp. entre 17% a 53% (Tuan *et al.*, 2011). Bajo estos

intervalos, los valores obtenidos en el presente informe superan los porcentajes de hidrofobicidad documentados en dichos patógenos.

4.4. Actividad antimicrobiana

A la fecha, se sostiene que los pingüinos antárticos son hospedadores y/o vectores de bacterias causantes de enfermedades infecciosas. A pesar de que ninguna investigación ha relacionado el fallecimiento de pingüinos con estos patógenos (Cerdà-Cuéllar *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2021), se decidió evaluar el potencial efecto antimicrobiano de las cepas lácticas aisladas en pingüinos contra tres microorganismos patógenos, dos Gram-negativos (*Samonella* ATCC 13076 y *Escherichia coli* ATCC 25922) y un Gram-positivo (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923).

Tabla 5. Actividad antimicrobiana de los aislados de bacterias ácido lácticas contra *S. enterica* ATCC 13076, *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923.

Cepa	<i>S. enterica</i> ATCC 13076			<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>S. aureus</i> ATCC 25923		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Experimental									
28 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	7 +++
28 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	11 +++
31 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	12 +++
Control									
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Elaboración propia.

Diámetro halo inhibición (mm).

Nota: A: Pellet, B: Sobrenadante, C: Cultivo total. (1): Original, (2): Duplicado. Zonas de inhibición clasificación (Gaudana *et al.*, 2010) sin inhibición (-), leve (+), fuerte (++) y muy fuerte (+++).

Para la prueba de antagonismo se apreció que las 12 cepas BAL (Tabla 5), incluyendo cepa control, fueron incapaces de producir zonas de inhibición ante *Samonella enterica* ATCC 13076 y *Escherichia coli* ATCC 25922 en todos sus formatos (cultivo total, pellet y sobrenadante). Aun así, los cultivos completos de las cepas 28 y 31 mostraron actividad antimicrobiana en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, donde los halos de inhibición varían desde los 7 mm a 12 mm de diámetro.

Con relación a estos resultados es pertinente manifestar que no se obtuvieron halos de inhibición en la cepa control (*L. plantarum*) contra ningún patógeno de prueba, pese a que *L. plantarum* ha sido documentada como una cepa capaz de presentar actividad antimicrobiana significativa frente a *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Hu *et al.*, 2019; Larrea *et al.*, 2007), además, en un ensayo anterior donde sólo se consideró el cultivo completo de las BAL se observaron leves halos de inhibición para *L. plantarum* ante *Samonella* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Por consiguiente, no hay que descartar la condición metabólica del cultivo láctico utilizado en el ensayo, puesto que, el tiempo de incubación fue de 24 horas, donde las bacterias lácticas se encuentran en fase exponencial y sólo se ven expresados metabolitos primarios asociados a ácidos orgánicos (Ramírez, 2016; Siedler *et al.*, 2019). Otros compuestos inhibidores como proteínas y péptidos de bajo peso molecular se producen a través de metabolitos secundarios generados durante la fase estacionaria (24–36 horas) (Ruiz, 2017; Sánchez y Peña, 2016).

A pesar de esta situación, se generaron halos de inhibición para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, donde se demostró que para ejercer un efecto inhibitor es imprescindible disponer del cultivo completo, dado que, al evaluar el sobrenadante libre de BAL no se visualizó un halo de inhibición. Ante este escenario, es relevante señalar, que la actividad antimicrobiana es un proceso multifactorial, que no depende únicamente de la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, sino también, tras el resultado de una competencia por nutrientes (Cifuentes, 2018; Martín del Campo *et al.*, 2008).

Pese al mecanismo empleado por las cepas 28 y 31, no hay que minimizar los resultados positivos contra *S. aureus*, considerando que es un patógeno de importancia en humanos, animales domésticos y vida silvestre, ya que, es una cepa que no se vincula exclusivamente con su especie de huésped, sino que, además, puede surgir una contaminación cruzada con otras especies (Van Elk *et al.*, 2012). Adicionalmente las cepas de *Staphylococcus aureus* pueden ser consideradas resistentes a la Meticilina (MRSA) (Lade y Kim, 2021).

Finalmente, referente a los efectos negativos en la inhibición de *Samonella enterica* ATCC 13076 y *Escherichia coli* ATCC 25922, estudios que evaluaron el carácter inhibitorio de las BAL aisladas en animales ante microorganismos Gram-negativos obtuvieron resultados similares a los descritos en este trabajo. Un ejemplo, es la evaluación de la actividad anti-*Salmonella* de 88 BAL aisladas de heces bovinas, donde sólo se obtuvo un 8% del total con resultados positivos, los cuales eran pertenecientes al género *Lactobacillus*

(Adetoye *et al.*, 2018; Castillo *et al.*, 2018). Basado en lo anterior, la composición de las bacterias Gram-negativas podrían limitar la actividad antimicrobiana al presentar una doble capa lipídica que inhibiría las interacciones entre las sustancias antagonistas de las cepas lácticas (Cortés *et al.*, 2018). Sin embargo, no se debe pasar por alto las concentraciones en la cuales actúan estos agentes antimicrobianos, puesto que Lin y Pan (2019), documentaron que las concentraciones del sobrenadante de *L. plantarum* NTU102 a medida que aumentaban, mayor era la zona de inhibición contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* BRC 14958.

5. CONCLUSIÓN

Los resultados logrados en las pruebas *in vitro* evidenciaron que las cepas lácticas aisladas en pingüinos antárticos poseen características funcionales capaces de resistir a las condiciones desfavorables similares al sistema digestivo de las aves. En cuanto a las pruebas para valorar la capacidad probiótica de las BAL, las cepas que lograron soportar cada una de las pruebas frente a condiciones de estrés (pH y concentraciones de sales biliares) e hidrofobicidad de la superficie celular, fueron las cepas 30, 31, 33 y 34. Sin embargo, no se puede descartar el comportamiento de las demás cepas, puesto que, los tiempos de exposición a pH y sales biliares pueden disparar al tiempo real del proceso de digestivo de los pingüinos.

Por otra parte, se evaluó la capacidad inhibitoria de las cepas BAL frente a cepas patógenas de *Samonella* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Los cultivos completos de las cepas 28 y 31 son los únicos aislados en presentar actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, donde la cepa 28 alcanzó un halo de inhibición promedio de 11,5 mm y la cepa 31 un halo de 7 mm. A pesar de no obtener resultados en la cepa control (47), no se puede desestimar la capacidad de las cepas en inhibir a *S. aureus*, debido que, las cepas lácticas fueron capaces de competir frente a la bacteria patógena a través de un mecanismo distinto a las sustancias antimicrobianas que se relacionan normalmente a un microorganismo láctico.

Finalmente, puede concluirse que los aislados de BAL obtenidos en pingüinos antárticos demostraron ser promisorios frente a condiciones adversas, mostrando potenciales propiedades probióticas. Por consiguiente, esta evaluación abre camino a la búsqueda de potenciales herramientas de mitigación y/o biorremediación ante enfermedades emergentes en animales silvestres, sin causar una alteración en su entorno, ni estilo de vida.

6. LITERATURA CITADA

1. Adetoye, A., E. Pinloche, B.A. Adeniyi and F.A. Ayeni. 2018. Characterization and anti-salmonella activities of lactic acid bacteria isolated from cattle faeces [en línea]. *BMC Microbiol.* 18: 96(Art. N°). <<https://doi.org/10.1186/s12866-018-1248-y>>. [Consulta: 16 mayo 2022].
2. Alberoni, D., F. Gaggia, L. Baffoni and D. Di Gioia. 2016. Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100: 9469-9482.
3. Almela, P., D. Velázquez, E. Rico, A. Justel and A. Quesada. 2022. Marine vertebrates impact the bacterial community composition and food webs of Antarctic microbial mats [en línea]. *Front. Microbiol.* 13: 841175(Art. N°). <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.841175>>. [Consulta: 06 junio 2022].
4. Amara, A.A., A. Shibl. 2015. Role of probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharm. J.* 23(2): 107-114.
5. Ambrosio, C.M.S., S.M. de Alencar, R.L.M. de Sousa, A.M. Moreno and E.M. Da Gloria. 2017. Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. *Ind. Crops Prod.* 97: 128-136.
6. Anadón, A., I. Ares, M.R. Martínez-Larrañaga and M. Añanzazu. 2019. Prebiotics and probiotics in feed and animal health. pp: 261-285. In: R.C.

- Gupta, A. Srivastava and R. Lall (Eds.). *Nutraceuticals in veterinary medicine*. Springer. Cham, Switzerland.
7. Arriata, D.A. 2019. *La protección de áreas marinas en la Antártica*. Memoria de título, Licenciada en Ciencias Jurídicas y Sociales. Universidad de Chile, Facultad de Derecho, Departamento de Derecho Internacional. Santiago, Chile.
 8. Ávila, J., M. Ávila, B. Tovar, M. Brizuela, Y. Perazzo y H. Hernández. 2010. Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Rev. Cient. (Maracaibo)* 20(2): 161-170.
 9. Balouiri, M., M. Sadiki and S. Koraichi. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6(2): 71-79.
 10. Balzarini, M.G., L. González, M. Tablada, F. Casanoves, J.A. Di Rienzo y C.W. Robledo. 2008. *InfoStat: software estadístico. Manual del usuario. Versión 2008*. Brujas. Córdoba, Argentina.
 11. Barbosa, A. 2011. Efectos del cambio climático sobre pingüinos antárticos. *Ecosistemas* 20(1): 33-41.
 12. Barbosa, A. 2018. Pingüino en la Antártida: testigos de excepción del cambio global. *Aves Naturaleza* 26: 22-25.
 13. Barreau, E., Y. Ropert-Courdert, K. Delord, C. Barbraud and A. Kato-Ropert. 2019. Scale matters: sea ice and breeding success of Adélie penguins. *Polar Biol.* 42: 1405-1410.

14. Barriga, G.P., D. Boric-Bargetto, M. Cortez, V. Neira, H. van Bakel, M. Thompsom, R. Tapia, D. Toro-Ascuy, L. Moreno, Y. Vasquez, M. Sallaberry, F. Torres-Pérez, D. González-Acuña and R.A. Medina. 2016. Avian influenza Virus H5 strain with North American and Eurasian lineage genes in an Antarctic penguin. *Emerg. Infect. Dis.* 22(12): 2221–2223.
15. Bertel, L., C. Betancur y L. Oviedo. 2019. Identificación de *Bacillus toyonensis* en heces de ganado cebú en el Departamento de Sucre, Colombia. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 21(2): 12-21.
16. Beshiru, A., I.H. Igbinosa and E.O. Igbinosa. 2018. Biofilm formation and potential virulence factors of *Salmonella* strains isolated from ready-to-eat shrimps [en línea]. *PLoS One* 13(9). <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204345>>. [Consulta: 16 mayo 2022].
17. BirdLife International. 2020a. Adelie Penguin: *Pygoscelis adeliae* [en línea]. IUCN Red List. <<https://www.iucnredlist.org/species/22697758/157660553>>. [Consulta: 25 mayo 2022].
18. BirdLife International. 2020b. Chinstrap Penguin: *Pygoscelis antarcticus* [en línea]. IUCN Red List. <<https://www.iucnredlist.org/species/22697761/184807209>>. [Consulta: 25 mayo 2022].

19. BirdLife International. 2020c. Emperor Penguin: *Aptenodytes forsteri* [en línea]. IUCN Red List. <<https://www.iucnredlist.org/species/22697752/157658053>>. [Consulta: 25 mayo 2022].
20. BirdLife International. 2020d. Gentoo Penguin: *Pygoscelis papua* [en línea]. IUCN Red List. <<https://www.iucnredlist.org/species/22697755/157664581>>. [Consulta: 25 mayo 2022].
21. Bonnedahl, J., T. Broman, J. Waldenström, H. Palmgren, T. Niskanen and B. Olsen. 2005. In search of human-associated bacterial pathogens in Antarctic wildlife: report from six penguin colonies regularly visited by tourists. *AMBIO J. Hum. Environ.* 34(6): 430-432.
22. Caballero, Y. 2014. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico en bovinos Holstein. Tesis, Maestra en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Texcoco, México.
23. Carranza, J. 1994. *Etiología: Introducción a la ciencia del comportamiento*. Universidad de Extremadura. Cáceres, España.
24. Castillo, P.L., C.A. Betancur y E. Pardo. 2018. Caracterización de microorganismos con potencial probiótico aislados de estiércol de terneros brahman en Sucre, Colombia. *Rev. Inv. Vet. Perú* 29(2): 438-448.

25. Cerdà-Cuéllar, M., E. Moré, T. Ayats, M. Aguilera, S. Muñoz-González, N. Antilles, P.G. Ryan and J. González-Solís. 2019. Do humans spread zoonotic enteric bacteria in Antarctica? *Sci. Total Environ.* 654: 190-196.
26. Cermeño, M. 2012. Estudio de propiedades de interés probiótico y tecnológico de dos cepas de *Lactobacillus plantarum*. Trabajo fin de Máster, Máster en Iniciación a la Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria, Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Zaragoza, España.
27. Che-Castaldo, C., S. Jenouvrier, C. Youngflesh, K.T. Shoemaker, G. Humphries, P. McDowall, L. Landrum, M.M. Holland, Y. Li, R. Ji and H.J. Lynch. 2017. Pan-Antarctic analysis aggregating spatial estimates of Adélie penguin abundance reveals robust dynamics despite stochastic noise [en línea]. *Nat. Commun.* 8: 832(Art. N°). <<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00890-0>>. [Consulta: 10 mayo 2022].
28. Chu, Z., Z. Yang, Y. Wang, L. Sun, W. Yang, L. Yang and Y. Gao. 2019. Assessment of heavy metal contamination from penguins and anthropogenic activities on Fildes Peninsula and Ardley Island, Antarctic. *Sci. Total Environ.* 646: 951-957.
29. Cifuentes, G. 2018. Aislamiento, identificación y caracterización de nuevos probióticos con propiedades funcionales para su aplicación en alimentación. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona,

Escola d'Enginyeria, Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental. Barcelona, España.

30. Constable, A.J., J. Melbourne-Thomas, E.P. Corney, K.R. Arrigo, C. Barbraud, D.K. Barnes, N.L. Bindoff, P.W. Boyd, A. Brandt, D.P. Costa, A.T. Davidson, H.W. Ducklow, L. Emmerson, M. Fukuchi, J. Gutt, M.A. Hindell, E.E. Hofmann, G.W. Hosie, T. Lida, S. Jacob, N.M. Johnston, S. Kawaguchi, N. Kokubun, P. Koubbi, M.A. Lea, A. Makhado, R.A. Massom, K. Meiners, M.P. Meredith, E.J. Murphy, S. Nicol, K. Reid, K. Richerson, M.J. Riddle, E.R. Rintoul, W.O. Smith, C. Southwell, J.S. Stark, M. Sumner, K.M. Swadling, K.T. Takahashi, P.N. Trathan, D.C. Welsford, H. Weimerskirch, K.J. Westwood, B.C. Wienecke, D. Wolf-Gladrow, S.W. Wright, J.C. Xavier and P. Ziegler. 2014. Climate change and Southern Ocean ecosystems I: How changes in physical habitats directly affect marine biota. *Global Change Biol.* 20(10): 3004-3025.
31. Cortés, J.C., L.F. Mejía e Y.F. Oyola. 2018. Evaluación del efecto inhibitorio de extractos obtenidos de bacterias ácido lácticos (BAL) frente al crecimiento de *Salmonella* spp. Tesis de grado. Universidad Libr. Pereira, Colombia.
32. Corzo, G., S.E. Gilliland. 1999. Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Int. J. Dairy Sci.* 82(3): 472-480.
33. D'amico, V.L., B. Marcelo, J. Benzal, N. Coria, V. Vidal, J.I. Diaz and A. Barbosa. 2016. Leukocyte counts in different populations of Antarctic

- Pygoscelid penguins along the Antarctic Peninsula. *Polar Biol.* 39: 199-206.
34. De La Peña-Lastra, S. 2021. Seabird droppings: effects on a global and local level [en línea]. *Sci. Total Environ.* 754. <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142148>>. [Consulta: 07 mayo 2022].
35. De Souza, W.M., M.J. Fumagalli, M.C. Martin, J. de Araujo, M.A. Orsi, L.F. Sanfilippo, S. Modha, E.I. Durigon, J.L. Módena-Proença, C.W. Arns, P.R. Murcia, L.T. Figueiredo. 2019. Pingu virus: a new picornavirus in penguins from Antarctica [en línea]. *Virus Evol.* 5(2). <<https://doi.org/10.1093/ve/vez047>>. [Consulta: 25 mayo 2022].
36. Di Fonzo, C., M. Ansaldo. 2022. Blood biochemistry and antioxidant status altered by anthropogenic impact in Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*) [en línea]. *An. Acad. Bras. Cienc.* 94(Suppl. 1). <<https://doi.org/10.1590/0001-3765202220210579>>. [Consulta: 01 junio 2022].
37. Dobson, A., J. Foufopoulos. 2001. Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 356(1411): 1001-1012.
38. Flores, H., J.A. van Franeker, V. Siegel, M. Haraldsson, V. Strass, E.H. Meesters, U. Bathmann and W.J. Wolff. 2012. The association of Antarctic krill *Euphausia superba* with the under-ice habitat [en línea]. *PLoS One* 7(2). <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031775>>. [Consulta: 11 mayo 2022].

39. Frampton, R.A., A.R. Pitman and P.C. Fineran. 2012. Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens [en línea]. *Int. J. Microbiol.* <<https://doi.org/10.1155/2012/326452>>. [Consulta: 17 junio 2022].
40. Frizzo, L.S., M.L. Signorini and M.R. Rosmini. 2018. Probiotics and prebiotics for the health of cattle. pp: 155-174. In: D. Di Gioia and B. Biavati (Eds.). *Probiotics and prebiotics in animal health and food safety*. Springer. Cham, Switzerland.
41. Gaudana, S.B., A.S. Dhanani and T. Bagchi. 2010. Probiotic attributes of *Lactobacillus* strains isolated from food and of human origin. *Br. J. Nutr.* 103: 1620-1628.
42. García, A., K. Navarro, E. Sanhueza, S. Pineda, E. Pastene, M. Quezada, K. Henríquez, A. Karlyshev, J. Villena and C. González. 2017. Characterization of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-*Helicobacter pylori* activity. *Electron. J. Biotechnol.* 25: 75-83.
43. García-Peña, F.J., M.T. Llorente, T. Serrano, M.J. Ruano, J. Belliure, J. Benzal, S. Herrera-León, V. Vidal, V. D'amico, D. Pérez-Boto and A. Barbosa. 2017. Isolation of *Campylobacter* spp. from three species of Antarctic penguins in different geographic locations. *EcoHealth* 14: 78-87.

44. Gómez, A., G. Kociubinski, P. Pérez and G. De Antoni. 1998. Isolation and characterization of Bifidobacterium strains for probiotic formulation. *J. Food Prot.* 61(7): 865-873.
45. González-Acuña, D., J. Hernández, L. Moreno, B. Herrmann, R. Palma, A. Latorre, G. Medina-Vogel, M.J. Kinsella, N. Martín, C. Araya, I. Torres, N. Fernández and B. Olsen. 2013. Health evaluation of wild Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) in the Antarctic Peninsula. *Polar Biol.* 36: 1749-1760.
46. Grimaldi, W.W., P.J. Seddon, P.O. Lyver, S. Nakagawa and D.M. Tompkins. 2015. Infectious diseases of Antarctic penguins: current status and future threats. *Polar Biol.* 38: 591-606.
47. Grzesiak, J., A. Kaczyńska, J. Gawor, K. Żuchniewicz, T. Aleksandrak-Piekarczyk, R. Gromadka and M.K. Zdanowski. 2020. A smelly business: microbiology of Adélie penguin guano (Point Thomas rookery, Antarctica) [en línea]. *Sci. Total Environ.* 714. <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136714>>. [Consulta: 25 mayo 2022].
48. Guo, Y., N. Wang, G. Li, G. Rosas, J. Zang, Y. Ma, J. Liu, W. Han and H. Cao. 2018. Direct and indirect effects of penguin feces on microbiomes in Antarctic ornithogenic soils [en línea]. *Front. Microbiol.* 9: 552(Art. N°). <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00552>>. [Consulta: 17 junio 2022].

49. Herman, R., A. Borowicz, M. Lynch, P. Trathan and H. Lynch. 2020. Update on the global abundance and distribution of breeding Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*). *Polar Biol.* 43: 1947-1956.
50. Hernández, F., N. Calisto-Ulloa, C. Gómez-Fuentes, M. Gómez, J. Ferrer, G. González-Rocha, H. Bello-Toledo, A.M. Botero-Coy, C. Boix, M. Ibañez and M. Montory. 2018. Occurrence of antibiotics and bacterial resistance in wastewater and sea water from the Antarctic. *J Hazard. Mater.* 363: 447-456.
51. Hinke, J.T., M.J. Polito, C. S. Reiss, S.G. Trivelpiece and W.Z. Trivelpiece. 2012. Flexible reproductive timing can buffer reproductive success of *Pygoscelis* spp. penguins in the Antarctic Peninsula region. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 454: 91-104.
52. Hinke, J.T., S.G. Trivelpiece and W.Z. Trivelpiece. 2017. Variable vital rates and the risk of population declines in Adélie penguins from the Antarctic Peninsula region [en línea]. *Ecosphere* 8(1). <<https://doi.org/10.1002/ecs2.1666>>. [Consulta: 18 junio 2022].
53. Holzapfel, W.H., P. Haberer, R. Geisen, J. Björkroth and U. Schillinger. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(2): 365s-373s.
54. Horackova, S., K. Vesela, I. Klojdova, M. Bercikova and M. Plockova. 2020. Bile salt hydrolase activity, growth characteristics and surface properties in *Lactobacillus acidophilus*. *Eur. Food Res. Technol.* 246: 1627-1636.

55. Hoyt, J.R., T.L. Cheng, K.E. Langwing, M.M. Hee, W.F. Frick and A.M. Kilpatrick. 2015. Bacteria isolated from bats inhibit the growth of *Pseudogymnoascus destructans*, the causative agent of white-nose syndrome [en línea]. PLoS One 10(4). <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121329>>. [Consulta: 25 agosto 2022].
56. Hu, C.-H., L.-Q. Ren, Y. Zhou and B.-C. Ye. 2019. Characterization of antimicrobial activity of three *Lactobacillus plantarum* strains isolated from chinese traditional dairy food. Food Sci. Nutr. 7(6): 1997-2005.
57. Hume, M.E. 2011. Historic perspective: Prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. Poult. Sci. 90(11): 2663-2669.
58. INACH (Chile). 2006. La Antártica nuestra. Una introducción a su conocimiento. INACH. Punta Arenas, Chile.
59. INACH (Chile). 2021. Enciclopedia visual de la Antártica: Un viaje por el corazón blanco de la Tierra. (2a. ed.). INACH. Punta Arenas, Chile.
60. IPCC (USA). 2019. The ocean and cryosphere in a changing climate: Special report on the ocean and cryosphere in a changing climate. Cambridge University Press. Cambridge. UK
61. Jara, D., H. Bello-Toledo, M. Domínguez, C. Cigarroa, P. Fernández, L. Vergara, M. Quezada-Aguiluz, A. Opazo-Capurro, C.A. Lima and G. González-Rocha. 2020. Antibiotic resistance in bacterial isolates from freshwater samples in Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica [en línea]. Sci. Rep. 10: 3145(Art. N°).

<<https://www.nature.com/articles/s41598-020-60035-0>>. [Consulta: 25 junio 2022].

62. Jerzsele, A., K. Szeker, R. Cszizinszky, E. Gere, C. Jakab, J.J. Mallo and P. Galfi. 2012. Efficacy of protected sodium butyrate, a protected blend of essential oils, their combination, and *Bacillus amyloliquefaciens* spore suspension against artificially induced necrotic enteritis in broilers. *Poult. Sci.* 91(4): 837-843.
63. Johansson, H., P. Ellström, K. Arturson, C. Berg, J. Bonnedahl, I. Hansson, J. Hernandez, J. López-Martín, G. Medina-Vogel, L. Moreno, B. Olse, E. Olsson, H. Skarin, K. Troell, J. Waldenström, J. Ågren and D. González-Acuña. 2018. Characterization of *Campylobacter* spp. isolated from wild birds in the Antarctic and Sub-Antarctic [en línea]. *PLoS One* 13(11). <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206502>>. [Consulta: 28 mayo 2022].
64. Jurado-Gámez, H., F. Calpa-Yama y A. Chaspuengal-Tulcán. 2014. Determinación in vitro de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersenia pseudotuberculosis* aislada de *Cavia porcellus*. *Rev. Fac. Med. Vet. Zoot.* 61(3): 241-257.
65. Jurado-Gámez, H.A., E.J. Zambrano-Mora y A. Pazos-Moncayo. 2021. Adición de un probiótico de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado en el alimento para pollos. *Univ. Salud* 23(2): 151-161.
66. Kahn, L.H., G. Bergeron, M.W. Bourassa, B. De Vegt, J. Gill, F. Gomes, F. Malouin, K. Opengart, G.D. Ritter, R.S. Singer, C. Storrs and E. Topp.

2019. From farm management to bacteriophage therapy: strategies to reduce antibiotic use in animal agriculture. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1441(1): 31-39.
67. Khusro, A., M. Valan, M.U. Khayam, A.Z.M. Salem, N.A. Al-Dhabi, R.R. Rivas-Caceres, V. Seidel and K.C. Choi. 2021. Assessment on in vitro probiotic attributes of *Lactobacillus plantarum* isolated from horse feces [en línea]. *J. Equine Vet. Sci.* 107. <<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103769>>. [Consulta: 19 junio 2022].
68. Kim, G.-B., B.H. Lee. 2008. Genetic analysis of a bile salt hydrolase in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* KL612. *J. Appl. Microbiol.* 105(3): 778-790.
69. Knarreborg, A., R.M. Engberg, S.K. Jensen and B.B. Jensen. 2002. Quantitative determination of bile salt hydrolase activity in bacteria isolated from the small intestine of chickens. *J. Appl. Microbiol.* 68(12): 6425-6428.
70. Kos, B., J. Šušković, S. Vuković, M. Šimpraga, J. Frece and S. Matošić. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* 94(6): 981-987.
71. Lade, H., J.-S. Kim. 2021. Bacterial targets of antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [en línea]. *Antibiotics* 10(4): 398(Art. N°). <<https://www.mdpi.com/2079-6382/10/4/398>>. [Consulta: 18 agosto 2022].

72. Lam, B.A., D.B. Walton and R.N. Harris. 2011. Motile zoospores of *Batrachochytrium dendrobatidis* move away from antifungal metabolites produced by amphibian skin bacteria. *EcoHealth* 8(1): 36-45.
73. Landa-Salgado, P., Y. Cabellero-Cervantes, E. Ramírez-Bribiesca, A.M. Hernández-Anguiano, L.M. Ramírez-Hernández, D. Espinosa-Victoria y D. Hernández-Sánchez. 2019. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico para becerros del altiplano mexicano. *Rev. Mex. Cienc. Pec.* 10(1): 68-83.
74. Lara, C., Á. Burgos. 2012. Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 14(1): 31-40.
75. Larrea, H., M. Flórez y J. Huapaya. 2007. Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas parte I. *Horiz. Med.* 7(1): 16-22.
76. Lee, Y.K., K.Y. Puong, A.C. Ouwehand and S. Salminen. 2003. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J. Med. Microbiol.* 52(Pt. 10): 925-930.
77. Lin, T.-H., T.-M. Pan. 2019. Characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus plantarum* NTU 102. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 52(3): 409-417.
78. Marcías, M.L., D. Deregibus, L.A. Saravia, G.L. Campana and M.L. Quartino. 2017. Life between tides: Spatial and temporal variations of

an intertidal macroalgal community at Potter Peninsula, South Shetland Islands, Antarctica. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 187: 193-203.

79. Marina, T.I., V.A. Salinas y G.F. Cordone. 2020. Las redes tróficas de la Antártida ante el cambio climático. *Investig. Cienc.* (527): 44-51.
80. Markowiak, P., K. Śliżewska. 2018. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition [en línea]. *Gut. Pathog.* 10: 21(Art. N°). <<https://gutpathogens.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13099-018-0250-0>>. [Consulta: 17 junio 2022].
81. Martín del Campo, C.I., H.E. Gómez y R. Alaníz de la O. 2008. Bacterias ácido lácticas con capacidad antagonica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos [en línea]. *e-Gnosis* 6: 5(Art. N°). <<https://www.redalyc.org/pdf/730/73011197005.pdf>>. [Consulta: 25 agosto 2022].
82. McKenzie, V.J., J.G. Kueneman and R.N. Harris. 2018. Probiotics as a tool for disease mitigation in wildlife: Insights from food production and medicine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1429(1):18-30.
83. Meyer, B., U. Freier, V. Grimm, J. Groeneveld, B.P.V. Hunt, S. Kerwath, R. King, C. Klaas, E. Pakhomov, K.M. Meiners, J. Melbourne-Thomas, E.J. Murphy, S.E. Thorpe, S. Stammerjohn, D. Wolf-Gladrow, L. Auerswald, A. Götz, L. Halbach, S. Jarman, S. Kawaguchi, T. Krumpfen, G. Nehrke, R. Ricker, M. Sumner, M. Teschke, R. Trebilco and N.I. Yilmaz. 2017. The winter pack-ice zone provides a sheltered but food-poor habitat for larval Antarctic krill. *Nat. Ecol. Evol.* 1: 1853-1861.

84. Miller, A.K., N.J. Karnovsky and W.Z. Trivelpiece. 2009. Flexible foraging strategies of Gentoo penguins *Pygoscelis papua* over 5 years in the South Shetland Islands, Antarctica. *Mar. Biol.* 156: 2527-2537.
85. Montes, M.J. 2005. Estudio taxonómico polifásico de bacterias procedentes de ambientes antárticos: Descripción de cuatro nuevas especies. Memòria de títol, Doctor en Biología. Universitat de Barcelona, Facultat de Farmàcia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries. Barcelona, España.
86. Ocaña, V.S., E. Bru, A.A.P. de Ruiz and M.L. Nader-Macias. 1999. Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45(5): 203-212.
87. Omonijo, F.A., L. Ni, J. Gong, Q. Wang, L. Lahaye and C. Yang. 2018. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Anim. Nutr.* 4(2): 126-135.
88. Otero, X.L., S. De La Peña-Lastra, A. Pérez-Alberti, T. Osorio and M.A. Huerta-Diaz. 2018. Seabird colonies as important global drivers in the nitrogen and phosphorus cycles [en línea]. *Nat. Commun.* 9: 246(Art. N°). <<https://www.nature.com/articles/s41467-017-02446-8>>. [Consulta: 02 mayo 2022].
89. Paitán, E., R. Santos, A. Sotelo, D. Zúñiga y C. Vílchez. 2019. Caracterización molecular de bacterias con potencial probiótico aisladas de heces de neonatos humanos. *Rev. Peru. Biol.* 26(1): 119-130.

90. Palachum, W., Y. Chisti and W. Choorit. 2018. In-vitro assessment of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* WU-P19 isolated from a traditional fermented herb. *Ann. Microbiol.* 68: 79-91.
91. Park, J.H., J. Song, N. Ahn, B.-H. Lee, H.C. Kim, W.S. Lee, C.Y. Choi, Y.-J. Lee, E.-K. Lee and H.S. Lee. 2021. Health surveillance of penguins in the Barton Peninsula on King George Island, Antarctica. *J. Wildl. Dis.* 57(3): 612-617.
92. Patel, S., R. Shukla and A. Goyal. 2015. Probiotics in valorization of innate immunity across various animal models. *J. Funct. Foods* 14: 549-561.
93. Pozos, L. 2018. Caracterización parcial de la actividad probiótica de diferentes bacterias ácido lácticas. Tesis, Maestra en Biotecnología. Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec. San Juan Bautista Tuxtepec, México.
94. Rahman, H.M., K.Q. Sakamoto, S.-I. Kitamura, L. Nonaka and S. Suzuki. 2015. Diversity of tetracycline-resistant bacteria and resistance gene *tet(M)* in fecal microbial community of Adélie penguin in Antarctica. *Polar Biol.* 38: 1775-1781.
95. Ramírez, M. 2016. Extracción y caracterización de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus thuringiensis*. Tesis, Maestría en Ciencias Químicas en el Área de Química Orgánica. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Químicas, Posgrado en Ciencias Químicas. Puebla, México.

96. Retamal, P., S. Llanos-Soto, L. Moreno, J. López, J. Vianna, J. Hernández, G. Medina-Vogel, F. Castañeda, M. Fresno and D. González-Acuña. 2017. Isolation of drug-resistant *Salmonella enterica* serovar enteritidis strains in Gentoo penguins from Antarctica. *Polar Biol.* 40: 2531-2536.
97. RingØ, E., S. Hoseinifar, K. Ghosh, H. Van Doan, B. Beck and S. Song. 2018. Lactic acid bacteria in finfish. An update [en línea]. *Front. Microbiol.* 9: 1818(Art. N°). <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01818>>. [Consulta: 17 junio 2022].
98. Rosenberg, M., H. Judes and E. Weiss. 1983. Cell surface hydrophobicity of dental plaque microorganisms in situ. *Infect. Immun.* 42(2): 831-834.
99. Ruiz, Y. 2017. Potencial probiótico de péptidos antimicrobianos in vitro de bacterias ácido lácticas del Pulque. Tesis, Maestra en Ciencias de Productos Naturales y Alimentos, Universidad Tecnológica de la Mixteca, División de Estudios de Posgrado. Huajuapán, México.
100. Sánchez, L., M. Omura, A. Lucas, T. Pérez, M. Llanes y C.L. Ferreira. 2015. Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidad probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. *Rev. Salud Anim.* 37(2): 94-104.
101. Sánchez, L., J. Peña. 2016. Actividad antimicrobiana de cepas *Lactobacillus* spp. contra patógenos causantes de mastitis bovina. *Rev. Salud Anim.* 38(2): 85-92.
102. Schär-Zammaretti, P., J. Ubbink. 2003. The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophys J.* 86(6): 4076-4092.

103. Siedler, S., R. Balti and A. Rute. 2019. Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Curr. Opin. Biotechnol* 56: 138-146.
104. Smith, T.M., R.L. Smith. 2007. *Ecología*. (6a. ed.). Pearson Educación. Madrid, España.
105. Strycker, N., A. Borowicz, M. Wethington, S. Forrest, V. Shah, Y. Liu, H. Singh and H.J. Lynch. 2020. Fifty-year change in penguin abundance on Elephant Island, South Shetland Islands, Antarctica: results of the 2019–20 census. *Polar Biol.* 44: 45-56.
106. Szatraj, K., A.K. Szczepankowska and M. Chmielewska-Jeznach. 2017. Lactic acid bacteria-promising vaccine vectors: possibilities, limitations, doubts. *J. Appl. Microbiol.* 123(2): 325--339.
107. Tarique, M., A. Abdalla, R. Masad, A. Al-Sbiei, J. Kizhakkayil, T. Osaili, A. Olaimat, S.Q. Liu, M. Fernandez-Cabezudo, B. al-Ramadi and M. Ayyash. 2022. Potential probiotics and postbiotic characteristics including immunomodulatory effects of lactic acid bacteria isolated from traditional yogurt-like products [en línea]. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 159. <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113207>>. [Consulta: 23 julio 2022].
108. Tatur, A. 1989. Ornithogenic soils of the maritime Antarctic. *Pol. Polar Res.* 10(4): 481-532.
109. Tatur, A., A. Myrcha and J. Niegodzisz. 1997. Formation of abandoned penguin rookery ecosystems in the maritime Antarctic. *Polar Biol.* 17: 405-417.

110. Thouzeau, C., G. Froget, H. Monteil, Y. von Le Maho and C. Harf-Monteil. 2003 Evidence of stress in bacteria associated with long-term preservation of food in the stomach of incubating king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). *Polar Biol.* 26: 115-123.
111. Tormo, R. 2006. Probióticos. Concepto y mecanismo de acción. *An. Pediatr.* 4(1): 30-41.
112. Tuan, V., M.S. Turner and G.A. Dykes. 2011. Influence of cell surface hydrophobicity on attachment of *Campylobacter* to abiotic surfaces. *Food Microbiol.* 28(5): 942-950.
113. Van Elk, C.E., H.A.M. Boelens, A. Van Belkum, G. Foster and T. Kuiken. 2012. Indications for both host-specific and introduced genotypes of *Staphylococcus aureus* in marine mammals. *Vet. Microbiol.* 156(3-4): 343-346.
114. Vélez, E.S., J.S. Menéndez. 2018. Determinación del crecimiento de cepas *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc 41 y Lmc) a diferentes niveles de pH, temperatura y sales biliares. Tesis, Médico Veterinario. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Carrera de Pecuaria. Calceta, Ecuador.
115. Wang, Q., R. Zhu, Y. Zheng, T. Bao and L. Hou. 2019. Effects of sea animal colonization on the coupling between dynamics and activity of soil ammonia-oxidizing bacteria and archaea in maritime Antarctica. *Biogeosciences* 16(20): 4113-4128.

116. Wille, M., M. Aban, J. Wang, N. Moore, S. Shan, J. Marshall, D. González-Acuña, D. Vijaykrishna, J. Butler, J. Wang, R.J. Hall, D.T. Williams and A.C. Hurt. 2019. Antarctic penguins as reservoirs of diversity for avian avulaviruses [en línea]. *J. Virol.* 93(11). <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00271-19>>. [Consulta: 10 mayo 2022].
117. Yilmaz, E.S., N.C. Güvensen 2016. In vitro biofilm formation in ESBL producing *Escherichia coli* isolates from cage bird. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 9(11): 1069-1074.
118. Zoumpopoulou, G., M. Kazou, V. Alexandraki, A. Angelopoulou, K. Papadimitriou, B. Pot and E. Tsakalidou. 2018. Probiotics and prebiotics: an overview on recent trends. pp: 1-34. In: D. Di Gioia and B. Biavati (Eds.). *Probiotics and prebiotics in animal health and food safety*. Springer. Cham, Switzerland.

7. APÉNDICE

Tabla A1. Crecimiento (DO A500nm) de las cepas lácticas a diferentes concentraciones de pH en caldo MRS, a las 24 horas.

Cepa	0 h	pH3		pH4		pH5		pH6	
		24 h	% resistencia	24 h	% resistencia	24 h	% resistencia	24 h	% resistencia
Experimental									
19	6,38	SC	SC	SC	SC	2,13	33,40 ± 0,18 ^{def}	5,50	86,13 ± 0,39 ^a
22	5,20	SC	SC	SC	SC	2,14	41,15 ± 1,41 ^{bc}	4,86	93,49 ± 2,19 ^a
23	6,19	SC	SC	SC	SC	2,07	33,43 ± 1,24 ^{def}	5,33	86,03 ± 3,79 ^a
26	5,44	SC	SC	SC	SC	2,53	46,54 ± 0,88 ^b	5,31	97,70 ± 0,29 ^a
28	6,07	SC	SC	SC	SC	2,36	38,82 ± 0,75 ^{cd}	5,76	94,89 ± 3,30 ^a
29	6,98	SC	SC	SC	SC	6,60	94,42 ± 0,76 ^a	6,73	96,39 ± 1,17 ^a
30	5,94	SC	SC	SC	SC	1,73	29,2 ± 0,68 ^f	5,67	95,42 ± 4,29 ^a
31	5,77	SC	SC	SC	SC	1,77	30,61 ± 1,16 ^{ef}	5,76	99,71 ± 0,61 ^a
32	5,07	SC	SC	SC	SC	1,86	36,66 ± 0,95 ^{cde}	4,96	97,91 ± 1,80 ^a
33	6,44	SC	SC	SC	SC	3,06	47,49 ± 2,51 ^b	5,68	88,27 ± 2,49 ^a
34	6,04	SC	SC	0,57	9,28 ± 0,40 ^b	1,64	27,06 ± 0,57 ^f	5,69	94,16 ± 3,81 ^a
Control									
47	13,56	SC	SC	2,90	21,41 ± 0,13 ^a	12,41	91,47 ± 1,46 ^a	12,09	89,18 ± 0,52 ^a

Fuente: Elaboración propia.

Nota: Los valores % resistencia expresan promedio ± error estándar. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los valores promedios para cada cepa evaluada a $p < 0,05$.

SC: Sin crecimiento

Tabla A2. Crecimiento (DO A500nm) de las cepas lácticas a diferentes concentraciones de sales biliares (% p/v) en caldo MRS, a las 24 horas.

Cepa	0 h	0,1%		0,3%		0,5%		1%	
		24 h	% resistencia	24 h	% resistencia	24 h	% resistencia	24 h	% resistencia
Experimental									
19	6,57	5,87	89,31 ± 0,99 ^{abc}	3,53	53,75 ± 1,37 ^{de}	3,91	59,56 ± 1,80 ^{bcd}	4,55	69,16 ± 2,67 ^{cde}
22	5,73	4,85	84,51 ± 2,33 ^{bcd}	3,73	65,11 ± 0,29 ^{abc}	3,96	69,31 ± 0,91 ^a	4,49	78,33 ± 0,07 ^{abc}
23	6,00	4,79	79,70 ± 3,47 ^{bcd}	3,44	57,27 ± 1,28 ^{cd}	3,50	58,21 ± 0,41 ^{cd}	4,43	73,73 ± 0,28 ^{bcd}
26	5,36	4,86	90,60 ± 1,71 ^{ab}	3,50	65,15 ± 1,62 ^{abc}	3,72	69,31 ± 3,04 ^a	4,30	80,11 ± 2,10 ^{abc}
28	5,72	4,59	80,20 ± 0,22 ^{bcd}	3,41	59,60 ± 0,82 ^{bcd}	3,79	66,25 ± 1,44 ^{ab}	4,47	78,09 ± 3,93 ^{abc}
29	7,30	4,42	60,50 ± 2,52 ^e	3,56	48,81 ± 1,24 ^{ef}	3,99	54,60 ± 1,08 ^d	4,58	62,72 ± 2,34 ^{de}
30	5,70	4,36	76,38 ± 2,16 ^d	3,56	62,40 ± 1,23 ^{abc}	3,77	65,98 ± 0,44 ^{abc}	4,58	80,34 ± 2,71 ^{ab}
31	5,40	4,27	78,99 ± 2,35 ^{cd}	3,63	67,16 ± 2,10 ^{ab}	3,49	64,63 ± 1,42 ^{abc}	4,40	81,41 ± 1,01 ^{ab}
32	5,45	4,32	79,18 ± 2,40 ^{cd}	3,78	69,30 ± 2,63 ^a	3,73	68,44 ± 2,14 ^a	4,63	84,86 ± 1,53 ^a
33	5,22	4,41	84,44 ± 0,15 ^{bcd}	3,00	57,48 ± 0,23 ^{cd}	3,61	69,16 ± 0,06 ^a	4,23	81,02 ± 1,20 ^{ab}
34	7,44	4,13	55,52 ± 1,97 ^e	3,54	47,54 ± 1,60 ^{ef}	3,88	52,10 ± 0,68 ^a	4,50	60,47 ± 1,12 ^e
Control									
47	8,89	8,75	98,38 ± 0,07 ^a	3,75	42,15 ± 1,80 ^f	3,69	41,55 ± 0,00 ^e	4,19	47,06 ± 0,76 ^f

Fuente: Elaboración propia.

Nota: Los valores % resistencia expresan promedio ± error estándar. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los valores promedios para cada cepa evaluada a $p < 0,05$.

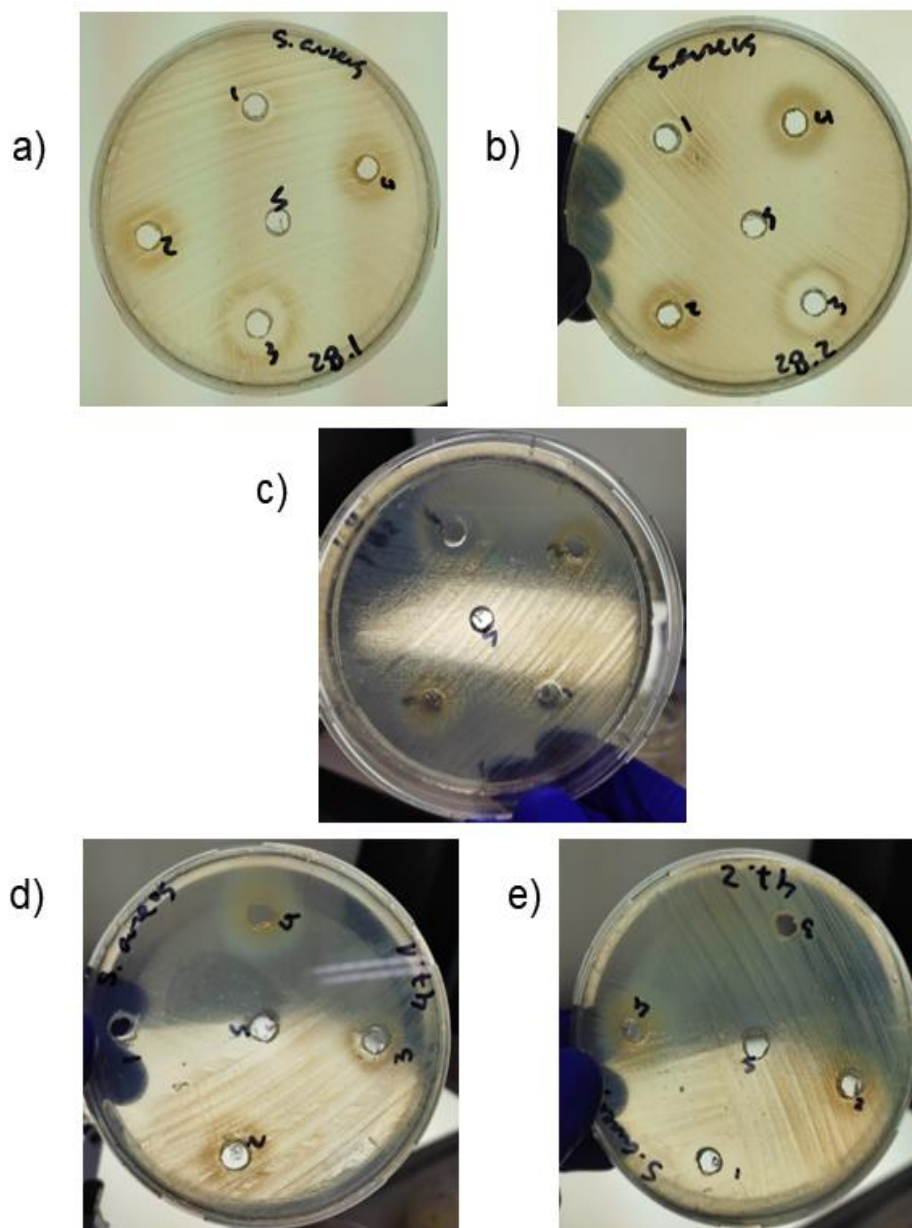


Figura A1. Registro actividad antimicrobiana de 3 cepas lácticas a) 28.1, b) 28.2, c) 31.1, d) 47.1 y e) 47.2 frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Fuente: Elaboración propia.