Obtención de microorganismos con actividad probiótica para animales monogástricos

Autoría principal

Yaneisy García Hernández[1] y Tania Pérez Sánchez[2].

Otros autores

Ramón Boucourt[1], Olivia Gironés[2], Nabil Halaihel[2], Jacques R. Nicoli[3], Imanol Ruiz-Zarzuela[2], José L. Balcázar[4], Mayriulis Pérez[1], Yanelys García[1], Bárbara Rodríguez[1], Zoraya Rodríguez[1], Carlos A. Rosa[3], Luciana Brandão[3], Madeleidy Martínez[1], Lourdes Savón[1], Lázara Ayala[1], Verena Torres[1], Nereyda Albelo[1], Odalys Núñez[1], Félix R. Herrera[1], Juan A. Guzmán[1], Yoslaidis Albelo[1], Yasmila Hernández[1], Yuri Rodríguez[1] y Aida C. Noda[1].

Entidades ejecutoras principales

1 Departamento de Fisiología y Bioquímica, Instituto de Ciencia Animal (ICA), Cuba
2 Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza (UNIZAR), España.
3 Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil.
4 Instituto Catalán de Investigación del Agua (ICRA), Parque Científico y Tecnológico de la Universitat de Girona, España.

Colaboradores

DrC. Arabel Elías. Instituto de Ciencia Animal, Cuba
DrC. Rafael Rodríguez. Instituto de Ciencia Animal, Cuba
DrC. Areadne Sosa. Instituto de Ciencia Animal, Cuba
DrC. Yoandra Marrero. Instituto de Ciencia Animal, Cuba
DrC. Niurca González. Instituto de Ciencia Animal, Cuba
DrC. Luis E. Dihigo. Instituto de Ciencia Animal, Cuba
DMV. Mabel Almeida. Instituto de Ciencia Animal, Cuba
DrC. Ana J. Rondón. Universidad Camilo Cienfuegos de Matanzas, Cuba
DrC. José L. Múzquiz. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España
DrC. Ignacio de Blas. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España
DrC. Daniel Vendrell. Laboratorios Hipra S.A., España
DrC. Daniel L. Merrifield. Centre for Agriculture and Rural Sustainability, Plymouth University, Devon, United Kingdom
DrC. Roy Dalmo. Norwegian College of Fisher Science, University of Tromsø, Tromsø, Norway
MSc. João L.S. Moreira. Instituto de Ciências Biológicas, Univ. Federal de Minas Gerais, Brasil
Téc. María del Carmen Uriel. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España
Téc. Jesús Orós. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España
Téc. Rafael Claver. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España
Téc. Félix Sierra. Instituto de Ciencia Animal, Cuba

Autor para correspondencia

Ing. Yaneisy García Hernández, DrC.
Dirección postal: Carretera Central km 47 ½, C.P 32700. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba
e-mail: yaneisyg@ica.co.cu

Aporte científico de cada autor al resultado

- ✓ **Ing. Yaneisy García Hernández, DrC.** (15 % de participación). Desarrolló la idea principal de la investigación. Fue la responsable de las etapas principales referidas a las investigaciones realizadas para la obtención de microorganismos con actividad probiótica de origen aviar y porcino, las que están incluidas en el proyecto de investigación que lideró "Obtención de una mezcla probiótica a partir de cepas microbianas aisladas de excretas de pollos de ceba fermentadas" del programa nacional GEPROP-CITMA (Código 00300318). Los resultados formaron parte de la tesis de Doctor en Ciencias Veterinarias y permitirán la elaboración de nuevos productos funcionales a partir de estos microorganismos, que posibilitarán incrementar los rendimientos productivos y los indicadores económicos de la producción animal. Además, la investigadora contribuye a la divulgación y posterior aplicación de los resultados a nivel nacional e internacional.
- ✓ **DMV. Tania Pérez Sánchez, DrC.** (15 % de participación). Desarrolló la idea principal de la investigación y fue la responsable de las etapas principales referidas a las investigaciones realizadas para la obtención de microorganismos con actividad probiótica a partir de salmónidos, las que están incluidas en tres proyectos de investigación de ministerios españoles. Los resultados formaron parte de una tesis de Doctor por la Universidad de Zaragoza con mención europea. Además, la investigadora contribuye a la divulgación de los resultados experimentales a través de publicaciones y eventos científico-técnicos.
- ✓ **DMV. Ramón Boucourt Salabarría, DrC.** (4 % de participación). Participó en la concepción de la idea principal de la investigación, asesoró el trabajo experimental y favoreció con sus conocimientos el desarrollo de las investigaciones. **DMV. Olivia Gironés Puñot, DrC.** (3 % de participación). Asesoró y financió el desarrollo de una parte del trabajo experimental, *in vitro* e *in vivo,* en el Laboratorio de Ictiopatología de la UNIZAR. Además, favoreció las investigaciones con sus conocimientos.
- ✓ **Lic. Nabil Halaihel Kassab, DrC.** (3 % de participación). Asesoró, en el laboratorio, el desarrollo de la identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas. Además, favoreció con sus conocimientos el desarrollo de las investigaciones y la divulgación de los resultados.
- ✓ **Lic. Jacques Robert Nicoli, DrC.** (4 % de participación). Permitió y asesoró el desarrollo de una parte del trabajo experimental, *in vitro*, en el Laboratorio de Ecología de Microrganismsos del Tracto Gastrointestinal del ICB, UFMG. Además, favoreció con sus conocimientos el desarrollo de las investigaciones y dirigió el proyecto CAPES/MES 072/09 "Seleção e identificação de microrganismos autóctones de origem aviária para uso em preparações probióticas" que financió parte de este trabajo.
- ✓ **DMV. Imanol Ruiz Zarzuela, DrC.** (3 % de participación). Asesoró la selección y evaluación de microorganismos con actividad probiótica aislados de salmónidos. Además, favoreció con sus conocimientos el desarrollo de las investigaciones.
- ✓ **DMV. José L. Balcázar Rojas, DrC.** (4 % de participación). Asesoró la identificación, selección y evaluación de microorganismos con actividad probiótica aislados de salmónidos. Además, favoreció con sus conocimientos el desarrollo de las investigaciones y contribuyó a la divulgación de los resultados en eventos científicos y publicaciones en revistas de impacto.
- ✓ **Lic. Mayriulis Pérez Jorge** (3 % de participación). Ejecutó la evaluación de la actividad probiótica de los microorganismos en pollos de ceba.
- ✓ **Lic. Yanelys García Curbelo, DrC.** (3 % de participación). Transmitió sus experiencias y consejos en la evaluación de aditivos y ejecutó parte del trabajo experimental con pollos de ceba.

- ✓ **DMV. Bárbara Rodríguez Sánchez, DrC.** (3 % de participación). Asesoró el manejo de pollos de ceba y ejecutó la evaluación de los candidatos probióticos en esta especie.
- ✓ **Lic. Zoraya Rodríguez Alonso, DrC.** (3 % de participación). Participó en la investigación de caracterización *in vitro* de bacterias ácido lácticas y levaduras candidatas a probiótico y favoreció con sus conocimientos el desarrollo de las investigaciones.
- ✓ **Lic. Carlos A. Rosa, DrC.** (3 % de participación). Permitió y asesoró la identificación de levaduras en el Laboratorio de Ecología y Biotecnología de Levaduras en el ICB, UFMG, y favoreció con sus conocimientos el desarrollo de las investigaciones.
- ✓ **Lic. Luciana Brandão, DrC.** (3 % de participación). Asesoró la identificación de levaduras y transmitió sus conocimientos en esta temática de investigación.
- ✓ **Lic. Madeleidy Martínez Pérez, DrC.** (2 % de participación). Participó y asesoró el análisis y discusión de los resultados del experimento en pollos de ceba.
- ✓ **Lic. Lourdes Savón Valdés, DrC.** (2 % de participación). Asesoró y participó en la ejecución de la evaluación de candidatos probióticos en cerdos en crecimiento, procesamiento y análisis de los resultados experimentales. Además, contribuyó con la revisión del material.
- ✓ **DMV. Lázara Ayala González, DrC.** (2 % de participación). Participó en la ejecución de la evaluación de candidatos probióticos en cerdos en crecimiento y en el análisis de los resultados experimentales.
- ✓ **Lic. Verena Torres, DrC.** (2 % de participación). Asesoró los diseños experimentales y parte de los análisis estadísticos.
- ✓ **Téc. Nereyda Albelo Dorta** (5 % de participación). Ejecutó parte del trabajo experimental de la identificación bioquímica y caracterización de los aislados microbianos, así como en la evaluación de los candidatos probióticos en pollos de ceba y cerdos en crecimiento. Además, contribuyó a la divulgación de los resultados en eventos científicos.
- ✓ **Téc. Odalys Núñez Peñalver** (5 % de participación). Ejecutó parte del trabajo experimental de la identificación bioquímica de los aislados microbianos, así como en la evaluación de los candidatos probióticos en pollos de ceba y cerdos en crecimiento. Además, contribuyó a la divulgación de los resultados en eventos científicos.
- ✓ **Téc. Félix R. Herrera** (3 % de participación). Ejecutó parte del trabajo experimental de la evaluación de los candidatos probióticos en pollos de ceba y cerdos en crecimiento.
- ✓ **DMV. Juan A. Guzmán Rondón** (2 % de participación). Facilitó y ejecutó la evaluación de la actividad probiótica de los microorganismos en pollos de ceba y cerdos en crecimiento.
- ✓ **Téc. Yoslaidis Albelo Fraga** (2 % de participación). Ejecutó la evaluación de la actividad probiótica de los microorganismos en pollos de ceba.
- ✓ **Téc. Yasmila Hernández Herrera** (2 % de participación). Ejecutó la evaluación de la actividad probiótica de los microorganismos en cerdos en crecimiento.
- ✓ **Téc. Yuri Rodríguez Fraga** (2 % de participación). Ejecutó la evaluación de la actividad probiótica de los microorganismos en cerdos en crecimiento.
- ✓ **Téc. Aida C. Noda Amoros** (2 % de participación). Participó en parte del procesamiento y análisis estadístico de los resultados.

Resumen

La introducción de probióticos en los sistemas de producción animal constituye una alternativa para incrementar el estado de salud de los animales y consecuentemente, la eficiencia productiva y económica. En este sentido, se realizó una secuencia experimental con el objetivo general de obtener microorganismos probióticos a partir de

diferentes ambientes para su uso en la producción de animales monogástricos. Se aislaron un total de 371 cepas y de ellas sólo veinticuatro bacterias lácticas y nueve levaduras mostraron potencialidades probióticas (cuatro de origen porcino, once de salmónidos y dieciocho de origen aviar). Estas cepas se identificaron por técnicas bioquímicas y moleculares como especies de los géneros Lactobacillus (n=11), Lactococcus (n=5), Pediococcus (n=2), Enterococcus (n=4), Leuconostoc (n=1), Weisella (n=1), Trichosporon (n=5), Pichia (n=1), Wickerhamomyces (n=2) y Kodamaea (n=1). Las colecciones microbianas se registraron y sus secuencias se depositaron en el GenBank. Además, se caracterizaron in vitro según su capacidad y velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación, tolerancia a pH ácidos y altas concentraciones de sales biliares, hidrofobicidad de la superficie celular y actividad antimicrobiana. Las cepas Lactobacillus pentosus LB-31, Wickerhamomyces anomalus LV-6, Lactobacillus plantarum CLFP-3, Lactococcus lactis CLFP-25 y Leuconostoc mesenteroides CLFP-68 tuvieron las mejores características como candidatas y cuando se evaluaron en pollos de ceba, truchas arcoíris y cerdos se determinó su actividad probiótica individual o combinada al modular la respuesta inmune y producir efectos benéficos en indicadores morfo-fisiológicos, productivos y de salud de los animales. Los resultados anteriores constituyen un importante aporte al conocimiento en la obtención de probióticos, incrementan la diversidad de cepas probióticas e informan la obtención de una mezcla probiótica, así como la identificación de una nueva subespecie de la especie Lactococcus lactis. La información se divulgó en una tesis de maestría, dos tesis de doctorado, un plegable, catorce publicaciones periódicas, doce memorias de eventos, un capítulo de libro y cincuenta participaciones en eventos científicos de carácter nacional e internacional. Además, los autores recibieron veintidós premios y cinco reconocimientos.

Comunicación corta

Durante décadas, los antibióticos se utilizaron en la producción animal como aditivos promotores del crecimiento para incrementar los rendimientos productivos. Sin embargo, su uso creó serios problemas de resistencia microbiana (Capriotti, 2007) y agudizó la aparición de efectos residuales en los alimentos para el consumo humano (Ferket *et al*., 2002 y Gauthier, 2003). Por tales razones, fue necesaria la introducción en las prácticas de alimentación y manejo de otros aditivos como los probióticos que contribuyeran a evitar los efectos negativos del uso de antibióticos.

Los probióticos son aditivos alimentarios formados por microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas influyen beneficiosamente en la salud del hospedero (FAO/WHO, 2001). Entre los microorganismos más utilizados para la elaboración de estos preparados se encuentran los cultivos microbianos puros, fundamentalmente de bacterias ácido lácticas y levaduras (Garlich, 1999) y los cultivos mixtos, que pueden incrementar la eficacia de los monocultivos (Bomba *et al*., 2002).

Al tener en cuenta los antecedentes anteriores y que uno de los factores que influyen en la respuesta probiótica es la especie o cepa(s) que se emplee, investigadores de diferentes instituciones nacionales e internacionales aunaron sus esfuerzos para presentar la siguiente propuesta que expone los resultados de varios proyectos de investigación pertenecientes al Ministerio de Educación Superior (MES), Programa Nacional de Biotecnología Agropecuaria del CITMA, Proyecto CAPES/MES 072/09, proyectos del Ministerio Español de Ciencia e

Innovación y del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España, así como de varias becas de formación profesional, investigación e intercambio académico.

El objetivo general de la presente propuesta fue obtener microorganismos con actividad probiótica a partir de diferentes ambientes para su uso en la producción de animales monogástricos. Para esto el trabajo se dividió en tres estudios: 1) Aislamiento e identificación de microorganismos con potencialidades probióticas a partir de diferentes ambientes; 2) Caracterización y selección *in vitro* de microorganismos candidatos a probiótico y 3) Evaluación *in vivo* de la actividad probiótica de los candidatos. Los resultados de estos estudios formaron parte de una tesis de maestría y dos tesis de doctorado, y se divulgaron en 14 publicaciones periódicas, 13 no periódicas, 1 plegable y 50 participaciones en eventos científicos de carácter nacional e internacional. Además, los resultados son de gran importancia porque permiten incrementar la diversidad de microorganismos probióticos, detectar los efectos que pueden ejercer en los animales y obtener preparados multicepas o multiespecies que potencien los efectos probióticos de los monocultivos. Además, se identificó una nueva subespecie de la especie *Lactococcus lactis*.

Principales Resultados

1. **Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas y levaduras a partir de diferentes ambientes (cerdos, aves y salmónidos)**

   Se realizaron tres experimentos donde se aislaron un total de 371 cepas a partir de muestras del contenido cecal de cerdos en crecimiento (*n*=9), excretas de pollos de ceba fermentadas (*n*=27), mucosa intestinal, branquias y mucus cutáneo de truchas arcoíris (*n*=335). De ellas sólo veinticuatro bacterias lácticas y nueve levaduras mostraron potencialidades probióticas. En el caso de las cepas porcinas, los cultivos purificados se identificaron como *Lactobacillus casei* (*n*=4) por la técnica de PCR-ARDRA (Reacción en Cadena de la Polimerasa-Análisis de Restricción de ADN Ribosomal Amplificado) con doce enzimas de restricción **(García *et al*. 2011)**. Las cepas de salmónidos se pre-seleccionaron según su actividad antimicrobiana frente a *Lactococcus garvieae*, agente causal de la lactococosis, y las de mayor actividad (*n*=11) se identificaron por secuenciación del gen 16S ARN ribosomal **(Pérez-Sánchez *et al*. 2011a)**, así como sus secuencias de nucleótidos se depositaron en el GenBank. Los resultados mostraron que las cepas con mayor potencialidad probiótica fueron de las especies *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* (CLFP-3), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (CLFP-25) y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteriodes* (CLFP-68). Posterior al proceso de selección e identificación de las candidatas se encontró una nueva subespecie perteneciente al género *Lactococcus*, a la que se ha denominado *Lactococcus lactis* subsp. *tructae* subsp. nov. **(Pérez-Sánchez *et al*. 2011b).**

   Nueve cepas de bacterias ácido lácticas y nueve cepas de levaduras se aislaron a partir de excretas de pollos de ceba fermentadas **(García, 2007; Elías, 2008 y García, 2010)**. Los cultivos puros de bacterias se identificaron por métodos bioquímicos tradicionales y por secuenciación del gen 16S ARNr, mientras que la identificación de las levaduras se confirmó por secuenciación de los dominios D1/D2 de la subunidad mayor (26S) del gen ARNr **(García-Hernández *et al*. 2012).** Los resultados para cada uno de los aislados mostraron sus características cepa-

específica y la identificación de especies de los géneros *Lactobacillus* (n=2), *Pediococcus* (n=2), *Enterococcus* (n=4), *Weisella* (n=1), *Trichosporon* (n=5), *Pichia* (n=1), *Wickerhamomyces* (n=2) y *Kodamaea* (n=1). Estos microorganismos forman parte del Banco de Microorganismos del Instituto de Ciencia Animal (Mayabeque, Cuba), se registraron en la Colección Cubana de Cultivos Microbianos y en el World Data Centre for Microorganisms (WDCM) y sus secuencias de nucleótidos se depositaron en el GenBank.

Garantizar la seguridad e inocuidad de los probióticos es un aspecto medular en el proceso de selección de los candidatos, por eso las cepas LB-17, LB-27, LB-28 y LB-33, identificadas como *Enterococcus hirae*, y LV-2, LV-3, LV-4, LV-10 y LV-11 del género *Trichosporon* se excluyeron de los estudios posteriores, al estar relacionadas con gran número de procesos infecciosos en varias especies de animales. El resto de las cepas se seleccionó para realizar su evaluación como candidatas a probiótico.

2. **Caracterización y selección in vitro de bacterias ácido lácticas y levaduras como candidatas a probióticos**

Las cepas CLFP-3, CLFP-25, CLFP-68, LB-12, LB-13, LB-25, LB-29, LB-31, LB-5B, LB-5C, LB-5D, LB-5F, LV-6, LV-8 y LV-9 seleccionadas en el estudio anterior se caracterizaron in vitro según su capacidad y velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación, tolerancia a pH ácidos, tolerancia a altas concentraciones de sales biliares, hidrofobicidad de la superficie celular (medida indirecta de la capacidad de adherencia al epitelio intestinal) y actividad antimicrobiana frente a patógenos de colecciones internacionales. Pruebas que, de forma simultánea, permitieron realizar un adecuado proceso de selección de los candidatos más promisorios y determinar sus posibles mecanismos de acción en el hospedero.

Cada microorganismo manifestó características específicas de la cepa, y con excepción de Lactobacillus crispatus LB-29 y L. casei (LB-5B, LB-5C, LB-5D, LB-5F), disminuyeron el pH del medio, toleraron bajos pH y altas concentraciones de sales biliares, mostraron buenas características de adherencia y un amplio espectro de resistencia a los antibióticos. Se determinó que su actividad antimicrobiana puede deberse, fundamentalmente, a la producción de ácido láctico y de compuestos de naturaleza proteica como las bacteriocinas (Peréz-Sánchez et al. 2011a). Lactobacillus pentosus LB-31 y Wickerhamomyces anomalus LV-6 fueron las cepas de origen aviar que presentaron las mejores características como candidatas y se enfrentaron, según la técnica de doble capa, para comprobar que no fueran antagónicas o se aglutinaran, acciones que interferirían en la respuesta biológica de los animales.

Los resultados de este estudio permitieron seleccionar las cepas L. plantarum subsp. plantarum CLFP-3, L. lactis subsp. cremoris CLFP-25, L. mesenteroides subsp. mesenteroides CLFP-68, L. pentosus LB-31, W. anomalus LV-6 y la mezcla de estas últimas para realizar la evaluación in vivo de su posible actividad probiótica.

3. **Evaluación *in vivo* de la actividad de bacterias lácticas y levaduras candidatas a probiótico**

Para determinar las respuestas tipo probiótica de las cepas seleccionadas en el estudio anterior se realizaron cuatro experimentos en pollos de ceba, cerdos y truchas arcoíris. Los experimentos con pollos de ceba y cerdos en crecimiento se realizaron en las unidades experimentales del Instituto de Ciencia Animal (Cuba) y los experimentos con truchas arcoíris en la piscifactoría experimental del Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza (España).

Experimento 1. Evaluación de la actividad probiótica de *Lactobacillus pentosus, Wickerhamomyces anomalus* y su mezcla en pollos de ceba.

Se establecieron cuatro grupos de animales (cien aves por tratamiento). Los grupos experimentales fueron: I) sin aditivos; II) con adición de la cepa de *L. pentosus* LB-31 a una concentración de 108 ufc·g-1; III) con adición de la cepa de *W. anomalus* LV-6 a una concentración de 108 ufc·g-1 y IV) con adición de la mezcla de las cepas de *L. pentosus* y *W. anomalus*, proporción 1:1 (v/v). El procedimiento y las condiciones experimentales se describen por **García-Hernández *et al*. (2014).** Con la inclusión de los candidatos y su mezcla en la dieta de los pollos de ceba se encontraron efectos benéficos en indicadores morfo-fisiológicos como el peso relativo del intestino delgado y los ciegos, lo que indicó una mejora de la estructura y salud intestinal y aumento de la eficiencia de los procesos digestivos, absortivos y metabólicos. También, se encontró, a los 42 d de edad de los animales, mejora en la respuesta vacunal, estimulación de la respuesta inmune e incrementos en los indicadores productivos y rendimientos cárnicos, fundamentalmente de la pechuga. Efectos que fueron dependientes del monocultivo o preparado multiespecie utilizado y de la edad de los animales.

Experimento 2. Evaluación de la actividad probiótica de *Lactobacillus pentosus* y su mezcla con *Wickerhamomyces anomalus* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Los animales se distribuyeron al azar en tres grupos (sesenta peces por estanque). Después de siete días de adaptación, los tratamientos fueron: I) sin aditivos; II) con adición de la cepa de *L. pentosus* LB-31 6 a una concentración de 107 ufc·g-1 y III) con adición de la mezcla de las cepas de *L. pentosus* y *W. anomalus*, proporción 1:1 (v/v). A los quince días de la inclusión de los candidatos en la dieta, se detectó, por PCR a tiempo real, que *L. pentosus* se encontró en el intestino de todos los animales y el número de copias de su ADN fue superior en los grupos tratados, lo que indicó que esta bacteria se adhirió al epitelio intestinal y lo colonizó después de su administración en la dieta, características que se corresponden con los resultados del estudio *in vitro*. Por el contrario, *W. anomalus* no se detectó en ninguna de las muestras analizadas del intestino de los peces. También, se determinó, por PCR tras transcripción inversa en tiempo real, el efecto de los candidatos en la expresión génica de algunas proteínas inmunomoduladoras en el riñón anterior. Los resultados indicaron la acción inmunorreguladora del *L. pentosus* LB-31 y su mezcla con *W.*

anomalus LV-6 en los peces, lo que confirma la respuesta inmune observada con los pollos de ceba.

Experimento 3. Evaluación de la actividad probiótica de *Lactobacillus pentosus* en cerdos en crecimiento.

Se establecieron dos grupos de animales según diseño de bloques al azar con seis réplicas y ocho animales por corral. Los grupos experimentales fueron: I) sin aditivos; II) con adición de la cepa de *L. pentosus* LB-31 a una concentración de 108 ufc·g-1. La respuesta probiótica se determinó a través de indicadores fisiológicos, productivos y de salud. El procedimiento y las condiciones experimentales se describen por **Ayala *et al*. (2014)**. Como principales resultados de la inclusión del lactobacilo en la dieta de los cerdos se observaron efectos en indicadores morfo-fisiológicos como intestino delgado, intestino grueso y ciego, se encontraron incrementos de peso vivo y ganancia media diaria y mejora en la conversión alimenticia. Así como, ninguno de los animales tratados tuvo diarreas ni se murieron, aunque para este último indicador no se detectaron diferencias estadísticas entre tratamientos. Estos resultados muestran el efecto probiótico que ejerce el lactobacilo en la salud de los animales y, consecuentemente, incrementa los rendimientos productivos.

Experimento 4. Evaluación de la actividad probiótica de *Lactobacillus plantarum* subsp*. plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp*. cremoris* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp*. mesenteroides* en truchas arcoíris **(Pérez-Sánchez *et al*. 2011c)**.

En este experimento se realizó un desafío experimental para determinar el efecto protector de los candidatos probióticos frente al agente causal de la lactococosis. Para esto los animales se distribuyeron al azar en cinco grupos (cuarenta y cinco peces por estanque).

Después de la adaptación, los tratamientos fueron: I y II) control; III) con adición de la cepa de *L. plantarum* CLFP-3; IV) con adición de la cepa de *L. lactis* CLFP-25 y V) con adición de la cepa de *L. mesenteroides* CLFP-68, todas a una concentración de 106 ufc·g-1. A los 21 días de inclusión de las bacterias, el 20 % de los peces de todos los grupos excepto el (I) se infectaron con *L. garvieae* (103 ufc·mL-1). Como resultado se obtuvo que solo los animales tratados con el *L. plantarum* mostraron protección frente al patógeno con respecto al grupo control (87,5 %de supervivencia vs 67,5 %, respectivamente). También, se detectó la respuesta inmune-moduladora a través de la expresión génica de IL-1β, IL-10 y TNF-α en muestras de riñón anterior y de IL-8, IgT y Tlr5 en el intestino de los peces.

En su conjunto, los resultados de evaluación *in vivo* confirman la respuesta biológica de tipo probiótica del *L. plantarum* subsp. *plantarum* CLFP-3, *L. pentosus* LB-31, *W. anomalus* LV-6 y la mezcla de estos últimos al modular la respuesta inmune e influir positivamente en algunos indicadores de salud y crecimiento de los animales.

NOVEDADES CIENTÍFICAS QUE SE DERIVAN DEL TRABAJO

- ✓ La identificación de una nueva subespecie de la especie *Lactococcus lactis*, que se denominó *L. lactis* subsp. *tructae*, aislada del mucus intestinal de salmónidos.
- ✓ Aislamiento, caracterización e identificación de las cepas *Lactobacillus pentosus* (LB-31), *Wickerhamomyces anomalus* (LV-6) y *Lactobacillus plantarum* (CLFP-3) con actividad probiótica en animales monogástricos.
- ✓ Obtención de una mezcla probiótica con cepas de origen aviar de las especies *L. pentosus* LB-31 y *W. anomalus* LV-6.
- ✓ Determinación de la respuesta tipo probiótica de las cepas *L. pentosus* LB-31, *W. anomalus* LV-6 y su mezcla en pollos de ceba a través de indicadores morfo-fisiológicos, productivos y de salud.
- ✓ Determinación del efecto inmunomodular de las cepas *L. pentosus* LB-31 y su mezcla con *W. anomalus* LV-6 en truchas arco iris.
- ✓ Evaluación de la respuesta tipo probiótica de la cepa *L. pentosus* LB-31 en cerdos en crecimiento a través de indicadores fisiológicos, productivos y de salud.
- ✓ Determinación del efecto protector de L. plantarum CLFP-3 frente a L. garvieae en truchas arco iris y su impacto en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune.

Aportes Científicos e Importancia del Trabajo

- ✓ Se cuenta con 26 cepas registradas en el GenBank, de ellas once candidatas a probiótico de las especies *Pediococcus pentosaceus* (LB-12 y LB-25), *Weisella cibaria* (LB-13), *Lactobacillus crispatus* (LB-29), *Lactobacillus pentosus* (LB-31), *Wickerhamomyces anomalus* (LV-6), *Pichia kudriavzevii* (LV-8), *Kodamaea ohmeri* (LV-9), *Lactobacillus plantarum* (CLFP-3), *Lactococcus lactis* (CLFP-25) y *Leuconostoc mesenteroides* (CLFP-68).
- ✓ Colecciones de bacterias ácido lácticas y levaduras identificadas por técnicas bioquímicas y moleculares, caracterizadas *in vitro,* con potencialidad de uso en la obtención de bio-productos, registradas en el World Data Centre for Microorganisms (WDCM) con los números de registro 999 y 1002, respectivamente y disponibles en el Instituto de Ciencia Animal.
- ✓ Aplicación de la metodología para la detección de citoquinas relacionadas con la respuesta inmunomoduladora de microorganismos probióticos.
- ✓ Las cepas probióticas, aisladas y caracterizadas, se pueden utilizar en la formulación de aditivos profilácticos o promotores del crecimiento animal y, adicionalmente, contribuirá a la reducción de importaciones de medicamentos y aditivos.
- ✓ Resultados con alto valor como material de consulta para los especialistas del tema de probióticos y su uso como aditivos promotores del crecimiento en la producción animal y, además, constituye un material de referencia para la obtención de

microorganismos con actividad probiótica a partir de diferentes ambientes (cerdos, aves y peces).

Bibliografia

Almeida, K.E.; Tamime, A.Y. & Oliveira, M.N. 2009. Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. Food Sci. Technol. 42:672-678

Al-Saiady, M.Y. 2010. Effect of probiotic bacteria on immunoglobulin G concentration and other blood components of newborn calves. J. Animal Veterinary Advances, 9:604-609

Altschul, S.; Madden, T.; Schaffer, A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. & Lipman, D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402

Anon. 1993. Removal of blood from laboratory mammals and birds. First report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW joint working group on refinement. Laboratory Animals, 27:1-22

Anon. 2003. Instructivo técnico. Producción avícola. Pollos de engorde. Tecnología de crianza y regulaciones sanitarias generales. UCAN-IIA, MINAG. La Habana, Cuba

Awad, W.A.; Ghareeb, K. & Böhm, J. 2010. Effect of addition of a probiotic micro-organism to broiler diet on intestinal mucosal architecture and electrophysiological parameters. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 94:486-494

Balcázar, J.L. 2006a. Selección y caracterización de cepas probióticas para la prevención de la forunculosis en trucha común (Salmo trutta fario). Memoria presentada para optar por el grado de Doctor. Universidad de Zaragoza, España. 154 p.

Balcázar, J.L; de Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Vendrell, D.; Cunningham, D. & Muzquiz, J.L. 2006b. The role of probiotics in aquaculture. Vet. Microbiol. 114:173-186

Balcázar, J.L; Vendrell, D.; de Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Gironés, O. & Muzquiz, J.L. 2006c. Immune modulation by probiotic strains: Quantification of phagocytosis of Aeromonas salmonicida by leukocytes isolated from gut of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) using a radiolabelling assay. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 29:335-343

Balzarini, M.G.; Casanoves, F.; Di Rienzo, J.A.; González, L.A. & Robledo, C.W. 2001. InfoStat versión 1.0. Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina

Bauer, A.; Kirby, M.; Sherris, J. & Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am. J. Clin. Patholog. 45:493-496

Beasley, S.S.; Takala, T.M.; Reunanen, J.; Apajalahti, J. & Saris, P.E.J. 2004. Characterization and electrotransformation of Lactobacillus crispatus isolated from chicken crop and intestine. Poult. Sci. 83:45-48

Bomba, A.; Nemcová, R.; Mudroňová, D. & Guba, P. 2002. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. TRENDS Food Sci. Technol. 13:121-126

Boyle, R.J.; Robins-Browne, R.M. & Tang, M.L.K. 2006. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? Am. J. Clin. Nutr. 83:1256-1264

Breed, R.; Murray, E.G.D.; Smith, N.R. (eds.). 1957. Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology. Seventh edition. The Williams & Wilkins Company. Baltimore, USA. p. 541-568

Brizuela, M.A. 2003. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. 133 p.

Brizuela, M.A. 2011. Desarrollo de productos probióticos y mezclas simbióticas para su empleo en alimentación y salud animal. En: Seminario Internacional de Sanidad Agropecuaria. 3-6 de mayo. La Habana, Cuba

Canibe, N. 2007. Alimentación de lechones. 1. Sitema de alimentación y aditivos en piensos de iniciación. En: XXIII Curso de especialización FEDNA. 25 y 26 de octubre. Madrid, España. p. 179-212

Capriotti, T. 2007. Resistant 'Superbugs' create need for novel antibiotics. Dermatol. Nurs. 19:65-70

Charlier, C.; Cretenet, M.; Even, S. & Le Loir, Y. 2009. Interactions between Staphylococcus aureus and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. Int. J. Food Microbiol. 131:30-39

Charteris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L. & Collins, J.K. 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic Lactobacillus and Bidobacterium species in mixed bacterial populations. Int.J. Food Microbiol. 35:1-27

Chichlowski, M.; Croom, J.; McBride, B.W.; Havenstein, G.B. & Koci, M.D. 2007. Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-fed-microbials on poultry: A brief review of current knowledge. Int. J. Poult. Sci. 6:694-704

Czerucka, D.; Piche, T. & Rampal, P. 2007. Review article: yeast as probiotics–Saccharomyces boulardii. Alimentary Pharmacol. Therapeutics 26:767-778

de Vries, M.C.; Vaughan, E.E.; Kleerebezem, M. & de Vosa, W.M. 2006. Lactobacillus plantarum-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. Int. Dairy J. 16:1018-1028

Deák, T.; Chen, J. & Beuchat, L.R. 2000. Molecular characterization of Yarrowia lipolytica and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. Appl. Environ. Microbiol. 66:4340-4344

Donovan, D.C.; Franklin, S.T.; Chase, C.C.L. & Hippen, A.R. 2002. Growth and health of Holstein calves fed milk replacers supplemented with antibiotics or Enteroguard. J. Dairy Sci. 85:947-950

Duncan, B. 1955. Multiple range and multiple F test. Biometrics. 11:1-42

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria in food. October 1-4. Cordoba, Argentina. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf (Fecha de consulta: 25 de enero de 2009)

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. April 30 and May 1. London Ontario, Canada. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf (Fecha de consulta: 25 de enero de 2009)

Ferket, P.R.; Parks, C.W. & Grimes, J.L. 2002. Benefits of dietary antibiotic and mannanologosaccharide supplementation for poultry. En: Multi-State Poultry Meeting. May 14-16. Marriot Hotel, Indianapolis, Indiana, USA

Fleet, G.H. & Balia, R. 2006. Chapter 12. The public health and probiotic significance of yeasts in foods and beverages. En: The yeast handbook. Querol, A. & Fleet, G. (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg , Germany. Vol. 2, p. 381-397 Fleet, G.H. 2007. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. Curr. Opinion Biotechnol. 18:170-175

Font, H.; Noda, A.C.; Torres, V.; Herrera, M.; Lizazo, D.; Sarduy, L. & Rodríguez, L. 2007. Programa ComparPro versión 1.0. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba

Fooks, L.J. & Gibson, G.R. 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. Br. J. Nutr. 88(Suppl. 1):S39-S49

Franz, C.M.A.P.; Stiles, M.E.; Scheleifer, K.H. & Holzapfel, W.H. 2003. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. Int. J. Food Microbiol. 88:105-122

Fuller, R. 1992. Chapter 1. History and development of probiotic. En: Probiotics. The Scientific Basic. Fuller, R. (ed.). Chapman & Hall, London, UK. p.

Gadanho, M. & Sampaio, J.P. 2002. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula*: *Rh. glutinis* sensu strict and *Rh. dairenensis* comb. nov. FEMS Yeast Res. 2:47-58

García, Y. 2007. Obtención de un producto con características probióticas potenciales a partir de la fermentación líquida de las excretas de pollos de ceba. Tesis en opción al grado de Maestro en Microbiología, mención Fermentaciones. Facultad de Biología, Universidad de la Habana. La Habana, Cuba. 52 p.

García, Y.; García, Y.; Nuñéz, O.; Dihigo, L.E.; Silva Moreira, J.L. & Nicoli, J.R. 2011. Aislamiento e identificacion de cepas de Lactobacillus de origen porcino con posibilidades de uso en preparados probióticos. Revista Computadorizada de Producción Porcina, 18(2):111-114

García-Hernández, Y.; Rodríguez, Z.; Brandão, L.R.; Rosa, C.A.; Nicoli, J.R.; Elías, A.; Pérez-Sánchez, T.; Boucourt, R. & Halaihel, N. 2012. Identification and *in vitro* screening of avian yeast for use as probiotic. Res. Vet. Sci. 93:798-802

Garlich, J.D. 1999. Microbiología del tracto intestinal aviar. En: XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura. 24 de septiembre. Lima, Perú

Gauthier, R. 2003. Nuevas alternativas en terapéutica aviar. En: XVIII Congreso Latinoamericano de Avicultura. 7-10 de octubre. Santa Cruz, Bolivia

Giang, H., Vietl, T., Ogle, B. & Lindberg, J. 2011. Effects of Supplementation of Probiotics on the Performance, Nutrient Digestibility and Faecal Microflora in Growingfinishing Pigs. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 24: 655

Gong, J.; Forster, R.J.; Yu, H.; Chambers, J.R.; Wheatcroft, R.; Sabour, P.M.; Chen, S. 2002. Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. FEMS Microbiol. Ecol. 41:171-179

Gorbach, S.L. 1996. The discovery of *Lactobacillus* GG. Nutr. Today, 31:2S-4S

Grimble, R.F. 1998. Nutritional modulation of cytokines biology. Nutr. 14:634-640

Gueimonde, M. & Salminen, S. 2006. New methods for selecting and evaluating probiotics. Digestive and Liver Dis. 38(Suppl. 2):S242-S247

Halaihel, N.; Ruiz-Zarzuela, I.; de Blas, I.; Évora, M.D.; Escudero, E.; García, Y.; Vendrell, D.; Alonso, J.L.; Gironés, O.; Múzquiz, J.L. & Castillo, J.A. 2009. Detección simultánea mediante PCR a tiempo real de *Renibacterium salmoninarum* y *Tetracapsuloides bryosalmonae* en salmónidos. En: Memorias del XII Congreso Nacional de Acuicultura. 24-26 de noviembre. Madrid, España. p. 268-269

Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Stanley, J.T. & Williams, S.T. (eds.). 1994. Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology. Ninth edition. The Williams & Wilkins Company. Baltimore, USA. p. 562-568

Holzapfel, W.H.; Haberer, P.; Geisen, R.; Björkroth, J. & Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am. J. Clin. Nutr. 73(Suppl.):365S-373S

Jadamus, A.; Vahjen, W. & Simon, O. 2001. Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. Arch. Anim. Nutr. 54:1-17

Klaenhammer, T.R. & Kleeman, E.G. 1981. Growth characteristics, bile sensitivity, and freeze damage in colonial variants of Lb. acidophilus. Applied and Environmental Microbiology 41:1461–1467

Kurtzman, C.P. & Robnett, C.J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie van Leeuwenhoek, 73:331-371

Lachance, M.A.; Bowles, J.M.; Starmer, W.T. & Barker, J.S. 1999. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Ausltralian Hibiscus flowers. Can. J. Microbiol. 45:172-177

Lan, P.T.N.; Sakamoto, M. & Benno, Y. 2004. Effects of two probiotic *Lactobacillus* strains on jejunal and cecal microbiota of broiler chicken under acute heat stress condition as revealed by molecular analysis of 16S rRNA genes. Microbiol. Immun. 48:917-929

Libkind, D.; Brizzio, S.; Ruffini, A.; Gadanho, M.; van Broock, M. & Sampaio, J.P. 2003. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. Antonie van Leuuwenhoek, 84:313-322

Lin, W.H.; Yu, B.; Jang, S.H. & Tsen, H.Y. 2007. Different probiotic propiertes for *Lactobacillus plantarum* strains isolated from swine and poultry. Anaerobe, 13:107-113

Ludovico, P.; Sousa, M.J.; Silva, M.T.; Leão, C. & Côrte-Real, M. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. Microbiol. 147:2409-2415

Martín, R.; Soberón, N.; Vaneechoutte, M.; Flórez, A.B.; Vázquez, F. & Suárez, J.E. 2008. Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates. Int. Microbiol. 11:261-266

Martins, F.S.; Barbosa, F.H.F.; Penna, F.J.; Rosa, C.A.; Nardis, R.M.D.; Neves, M.J. & Nicoli, J.R. 2005. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes *in vitro*. Rev. Biol. Cienc. Tierra, Vol. 5, Número 2, 2º Semestre. Fecha de consulta: marzo de 2011

Martins, F.S.; Dalmasso, G.; Arantes, M.R.E.; Doye, A.; Lemichez, E.; Lagadec, P.; Imbert, V.; Peyron, J.F.; Rampal, P.; Nicoli, J.R. & Czerucka, D. 2010. Interaction of

Saccharomyces boulardii with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. PLoS ONE, 5(1):e8925

Matsuzaki, T. 1998. Immunomodulation by treatment with Lactobacillus casei strain Shirota. Int. J. Food Microbiol. 41:133-140

Mattila-Sandholm, T.; Mättö, J. & Saarela, M. 1999. Lactic acid bacteria with health claims-interactions and interference with gastrointestinal flora. Int. Dairy J. 9:25-35

Mejia-Silva, W., Rubio-Guillén, J., Calatayud-Márquez, D., Rodríguez-Caldera, A. y Quintero-Moreno, A. 2007. Nota Técnica. Evaluación de dos probióticos sobre parámetros productivos en lechones lactantes. Zootecnia Tropical, 25(4):301-306

Milián, G. 2009. Obtención de cultivos de *Bacillus* spp. y sus endosporas. Evaluación de sus actividad probiótica en pollos (*Gallus gallus domesticus*). Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. 134 p.

Missotten, J.A.M.; Goris, J.; Michiels, J., Van Coillie, E., Herman, L.;, De Smet, S., Dierick, N.A. &Heyndrickx, M. 2009. Screening of isolated lactic acid bacteria as potential beneficial strains for fermented liquid pig feed production. Animal Feed Sci. Technol. 150:122-138

Moreira, J.L.S. 2005. Isolamento, identificação molecular e selecão de linhagens probióticas de lactobacilos aviários para uso como veículo de uma vacina oral contra Eimeriose. Monografia. ICB, UFMG, Brasil. 69 p.

Moreira, J.L.S., Mota, R.M., Horta, M.F., Teixeira, S.M.R., Neumann, E., Nicoli, J.R. y Nunez, A.C. 2005. Identification to the species level of Lactobacillus isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. BMC Microbiology, 5:15

Moslehi-Jenabian, S.; Lindegaard, L. & Jespersen, L. 2010. Review: beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. Nutrients 2:449-473

Ogier, J.C. & Serror, P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. Int. J. Food Microbiol. 126:291-301

Orberá, T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev. Iberoamericana Micol. 21:15-19

Ouwehand, A.C.; Kirjavainen, P.V.; Grönlund, M.M.; Isolauri, E. & Salminen, S.J. 1999. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. Int. Dairy J. 9:623-630

Passoth, V.; Fredlund, E.; del Druvefors, U. & Schnürer, J. 2006. Minireview: Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. FEMS Yeast Res. 6:3-13

Peralta, M.F.; Mianzzo, R.D. & Nilson, A. 2008. Levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) en la alimentación de pollos de carne. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504. Volumen IX, Número 10. Disponible en: http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101008.html (Fecha de consulta: febrero de 2011)

Pérez, L.S.; Talavera, M.; Monroy, H.G.; Lagunas, S.; Cuarón, J.A.; Montes de Oca, R. & Vázquez, J.C. 2005. *In vitro* evaluation of the binding capacity of *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 to adhere to the wall of *Salmonella* spp. Rev. Latinoamericana Microbiol. 47:70-75

Pérez, M. 2000. Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. 130 p.

Pérez, T.; Balcázar, J.L.; García, Y.; Halaihel, N.; Vendrell, D.; de Blas, I.; Merrifiel, D.L. & Ruiz-Zarzuela, I. 2011. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. J. Fish Diseases, 34:499-507

Pérez, T.; Balcázar, J.L.; Ruiz-Zarzuela, I.; Halaihel, N.; Vendrell, D.; de Blas, I.; Múzquiz, J.L. 2010. Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. Mucosal Immunology. 3:355-360

Prasad, J.; Gill, H.; Smart, J. & Gopal, P.K. 1998. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. Int. Dairy J. 8:993-1002

Prescott, L.M.; Harley, J.P. & Klein, D.A. 2003. Capítulo 6. Crecimiento microbiano. En: Microbiología, Parte II Nutrición, crecimiento y control de los microorganismos. p. 114-136. Cuarta edición. McGraw-Hill·Interamericana de España, S.A.U.

Recio, I. & López-Fandiño, R. 2005. Ingredientes y productos lácteos funcionales: bases científicas de sus efectos en la salud. En: Alimentos Funcionales. Edición de la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT). Madrid, España. p. 23-100

Reid, G. 1999. Minireview: The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. Appl. Environ. Microbiol. 65:3763-3766

Ringø, E.; Bendiksen, H.R.; Wesmajervi, M.S.; Olsen, R.E.; Jansen, P.A.; Mikkelsen, H. 2000. Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). J. Appl. Microbiol. 89:317-322

Rogosa, M., Mitchell, J.A. & Wiseman, R.F. 1951. A selective medium for the isolation of oral and faecal lactobacilli. J. Bacteriol. 62:132-133

Rondón, A.J. 2009. Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación de su efecto probiótico en estos animales. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. 131 p.

Rondón, A.J., Ojito, Y., Arteaga, F.G., Laurencio, M., Milián, G y Pérez, Y. 2013. Probiotic effect of *Lactobacillus salivarius* C 65 on productive and health indicators of lactating piglets. Cuban Journal of Agricultural Science, 47(4): 401-407

Salminen, S. & von Wright, A. 1998. Current Probiotics-Safety Assured? Microbial. Ecol. Health Dis. 10:68-77

Salminen, S.; von Wright, A.; Morelli, L.; Marteau, P.; Brassart, D.; de Vos, W.M.; Fondén, R.; Saxelin, M.; Collins, K.; Mogensen, G.; Birkeland, S.E.; Mattila-Sandholm, T. 1998. Demonstration of safety of probiotics-a review. Int. J. Food Microbiol. 44:93-106

Salminen, S.; von Wright, A.; Morelli, L.; Marteau, P.; Brassart, D.; de Vos, W.M.; Fondén, R.; Saxelin, M.; Collins, K.; Mogensen, G.; Birkeland, S.E.; Mattila-Sandholm, T. 1998. Demonstration of safety of probiotics-a review. Int. J. Food Microbiol. 44:93-106

Sanz, Y.; Collado, M.C. & Dalmau, J. 2003. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. Acta Pediátrica Española. 61:476-482

Schillinger, U. & Lücke, F.K. 1989. Antibacterial activity of Lactobacillus sakei isolated from meat. Appl. Environm. Microbiol. 55:1901-1906

Shareef, B.T.; Harun, A.; Roziawati, Y.; Bahari, I.S.; Deris, Z.Z. & Ravichandran, M. 2008. Recurrent *Trichosporon asahii* glossitis: A Case Report. J. Contemporary Dental Practice. 9:1-5

Silva, A.M.; Bambirra, E.A; Oliveira, A.L; Souza, P.P; Gomes, D.A.; Vieira, E.C. & Nicoli, J.R. 1999. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritis* subsp. *typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice. J. Appl. Microbiol. 86:331-336

Silva, V.; Zepeda, G. & Alvarado, D. 2003. Infección urinaria nosocomial por *Trichosporon asahii*. Primeros dos casos en Chile. Rev. Iberoamericana Micol. 20:21-23

Spanhaak, S., Havenaar, R. y Schaafsma, G. 1998. The effect of consumption of milk fermented by Lactobacillus casei strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. European Journal of Clininical Nutrition, 52:899-907

Tagg, J.R.; Dajani, A.S. & Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40:722-756

Tannock, G.W. 1997. Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. TIBTECH. 15:270-274

Taylor, K. 1995. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. Applied Biochem. Biotechnol. 56:49-58

Téllez-Castillo, C.J.; Gil-Fortuño, M.; Centelles-Sales, I.; Sabater-Vidal, S. & Pardo Serrano, F. 2008. Infección fatal por *Trichosporon asahii* en una recién nacida de pretérmino. Rev. Chilena Infeccion, 25:213-215

Tilsala-Timisjarvi, A. y Alatossava, T. 1997. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. International Journal of Food Microbiology, 35:49-56

Vela, A.I.; Fernández, A.; Moreno, B.; Casamayor, A.; Chacón, G.; Villa, A.; Comenge, J.; Fernández-Garayzábal, J.F. 2010. Isolation of *Enterococcus hirae* from suckling rabbits with diarrhea. Veterinary Record 167:345-346

Vinderola, C.G. & Reinheimer, J.A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative ‘‘in vitro’’ study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Res. Int. 36:895-904

Walker, D.K. & Gillilland, S.E. 1993. Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation and assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus. J Dairy Sci. 76:956-961

Waters, S.M.; Doyle, S.; Murphy, R.A. & Power, R.F.G. 2005. Development of solution phase hybridisation PCR-ELISA for the detection and quantification of *Enterococcus faecalis* and *Pediococcus pentosaceus* in Nurmi-type cultures. J. Microbiol. Methods 63:264- 275

Waters, S.M.; Murphy, R.A. & Power, R.F.G. 2006. Characterisation of prototype Nurmi cultures using culture-based microbiological techniques and PCR-DGGE. Internat. J. Food Microbiol. 110:268-277

Wintrobe, M.M. 1971. Hematología clínica. Tercera edición. Ed. Revolución. Instituto Cubano del Libro. Ciudad Habana, Cuba. 976 p.

Wolf, D.G.; Falk, R.; Hacham, M.; Theelen, B.; Boekhout, T.; Scorzetti, G.; Shapiro, M.; Block, C.; Salkin, I.F. & Polacheck, I. 2001. Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* infection of non-granulocytopenic patients in three intensive care units. J. Clin. Microbiol. 39:4420-4425

Wynne, A.G.; Gibson, G.R. & Brostoff, J. 2006. Composición que comprende una cepa de *Lactobacillus pentosus* y usos de la misma. Patente Europea. ES 2 245 411 T3

Yang, Y.; Iji, P.A. & Choct, M. 2009. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. World Poult. Sci. J. 65:97-114

Zlotkin, A.; Eldar, A.; Ghittino, C. & Bercover, H. 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. J. Clin. Microbiol. 36:983-985