

## Adición de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado sobre parámetros intestinales, inmunes, productivos y bioquímica sanguínea en pollos\*

### Addition of *Lactobacillus plantarum* microencapsulated on intestinal, immune, productive parameters and bloody biochemistry in chickens

### Adição de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado em parâmetros intestinais, imunes, produtivos e bioquímica sangrenta em frangos

JURADO-GÁMEZ, HENRY<sup>1</sup>; ZAMBRANO-MORA, EDWARD<sup>2</sup>; FAJARDO-ARGOTI, CATALINA<sup>3</sup>

#### Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 5 de Junio 2019.

Aprobado para publicación: 11 de Septiembre 2019.

\* Proyecto de Investigación de origen: "Evaluación *In vivo* de la actividad probiótica de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado sobre morfología intestinal, parámetros productivos, inmunológicos, y bioquímicos en pollo de engorde". Financiación: Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales (VIPRI) Universidad de Nariño. Finalización: 2019.

- 1 Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Programa de Zootecnia, Grupo de Investigación en Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Producción Animal - Forrajes y Apicultura (PROBIOTEC-FORAPIS). Ph.D en Ingeniería con Énfasis en Ingeniería de Alimentos. Pasto, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-2118-7997>
- 2 Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento Salud Animal, Programa Medicina Veterinaria, Grupo de Investigación en Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Producción Animal - Forrajes y Apicultura (PROBIOTEC-FORAPIS). M.Sc. Ciencias Agrarias. Pasto, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-8443-2243>
- 3 Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Programa de Zootecnia, Grupo de Investigación en Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Producción Animal - Forrajes y Apicultura (PROBIOTEC-FORAPIS). M.Sc (c) en Producción Animal. Pasto, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-1993-6573>

Correspondencia: [henryjugam@gmail.com](mailto:henryjugam@gmail.com)

## RESUMEN

El sector avícola presenta problemas sanitarios que disminuyen su productividad, por ello el objetivo fue evaluar el efecto de *L. plantarum* microencapsulado en pollo de engorde. Se valoraron las características del microencapsulado (viabilidad, eficiencia y variables físicas), los parámetros productivos (consumo de materia seca, ganancia de peso y conversión alimenticia), bioquímicos (colesterol, triglicéridos y proteínas totales) e histopatológicos en aves sometidas a cuatro tratamientos; dos testigos (sin probiótico y probiótico comercial) y dos con suministro de *L. plantarum* (con y sin microencapsular). Los resultados demostraron que la cepa tiene un crecimiento adecuado a diferentes condiciones gastrointestinales *in vitro*, que le da ventajas para atravesar el tracto gastrointestinal. Por otra parte, los resultados para el estudio *in vivo* demostró que el suministro de la bacteria láctica tienen efectos positivos sobre los parámetros productivos, aunque no se realizó una comparación con otros estudios debido a las condiciones particulares de la investigación. Se observó un incremento de los niveles de colesterol y triglicéridos con el suministro de la cepa probiótica, al igual que un incremento de las lesiones histopatológicas. *L. plantarum* microencapsulado tiene potencial como aditivo probiótico en el sector avícola, aunque debe mejorarse la investigación en la cantidad de inóculo a suministrar.

## ABSTRACT

The poultry sector has health problems that decrease its productivity, so the objective was to evaluate the effect of microencapsulated *L. plantarum* in broilers. The characteristics of the microencapsulation (viability, efficiency and physical variables), the productive parameters (dry matter consumption, weight gain and food conversion), biochemicals (cholesterol, triglycerides and total proteins) and histopathological in birds undergoing four treatments were evaluated; two witnesses (without commercial probiotic and probiotic) and two with supply of *L. plantarum* (with and without microencapsular). The results showed that the strain has adequate growth to different gastrointestinal conditions *in vitro*, which gives it advantages to cross the gastrointestinal tract. On the other hand, the results for the *in vivo* study showed that the supply of lactic bacteria have positive effects on the productive parameters, although no comparison was made with other studies due to the particular conditions of the investigation. An increase in cholesterol and triglyceride levels was observed with the supply of the probiotic strain, as well as an increase in histopathological lesions. Microencapsulated *L. plantarum* has potential as a probiotic additive in the poultry sector, although research on the amount of inoculum to be supplied should be improved

## PALABRAS CLAVE:

BAL; Broiler; *In vivo*; Probiótico; *Lactobacillus plantarum*.

## KEYWORDS:

LAB; Broiler; *In vivo*; Probiotic; *Lactobacillus plantarum*.

## PALAVRAS CHAVE:

BAL; Frangos de corte; *In vivo*; Probiótico; *Lactobacillus plantarum*.

---

Cómo citar este artículo: JURADO-GÁMEZ, HENRY; ZAMBRANO-MORA, EDWARD; FAJARDO-ARGOTI, CATALINA. Adición de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado sobre parámetros intestinales, inmunes, productivos y bioquímica sanguínea en pollos. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 217-229. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)217-229](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)217-229)

## RESUMO

O setor avícola apresenta problemas de saúde que diminuem sua produtividade, portanto, o objetivo foi avaliar o efeito de *L. plantarum* microencapsulado em frangos de corte. Foram avaliadas as características da microencapsulação (viabilidade, eficiência e variáveis físicas), parâmetros produtivos (consumo de matéria seca, ganho de peso e conversão alimentar), bioquímicos (colesterol, triglicerídeos e proteínas totais) e histopatológicos em aves submetidas a quatro tratamentos; duas testemunhas (sem probiótico comercial e probiótico) e duas com suprimento de *L. plantarum* (com e sem microencapsular). Os resultados mostraram que a cepa tem crescimento adequado para diferentes condições gastrointestinais *in vitro*, o que oferece vantagens para atravessar o trato gastrointestinal. Por outro lado, os resultados do estudo *in vivo* mostraram que o suprimento de bactérias lácticas tem efeitos positivos nos parâmetros produtivos, embora nenhuma comparação tenha sido feita com outros estudos devido às condições particulares da investigação. Foi observado um aumento nos níveis de colesterol e triglicerídeos com o suprimento da cepa probiótica, bem como um aumento nas lesões histopatológicas. *L. plantarum* microencapsulado tem potencial como aditivo probiótico no setor avícola, embora a pesquisa sobre a quantidade de inóculo a ser fornecido deva ser melhorada

## INTRODUCCIÓN

El sector avícola ha tenido un creciente avance, gracias a la acción conjunta de genética, nutrición, sanidad y manejo [1]. Sin embargo, la presión de los mercados por una mayor demanda de este producto, genera la búsqueda de animales con un crecimiento rápido y con una mayor calidad de carne [2]. Esto crea inconvenientes en el manejo de grandes poblaciones, especialmente la parte sanitaria, que hace uso intensivo de los antibióticos promotores de crecimiento como medios para controlar la proliferación de microorganismos patógenos [3].

La introducción de promotores de crecimiento (APC-antibióticos en dosis subterapéuticas) en la alimentación animal no sólo influye en las poblaciones microbianas intestinales y sus actividades, sino que además, afectan el metabolismo del animal y alteran específicamente la función intestinal [4-6]. Junto a lo anterior, el uso indiscriminado de los antibióticos ha producido graves problemas sobre el control de las enfermedades de origen bacteriano, ya que en los últimos años se ha incrementado la aparición de microorganismos resistentes, que dificulta su manejo sanitario en humanos y animales [7].

Como respuesta a este problema, la investigación ha centrado sus esfuerzos en la búsqueda de nuevas alternativas que promuevan una producción más limpia, sin el uso de aditivos que pongan en riesgo la salud humana y animal [8]. Esto incluye mejorar las normas de bioseguridad y manejo en las producciones avícolas, aplicando un programa de vacunación, haciendo selección genética y realizando la búsqueda, desarrollo y utilización de nuevos aditivos nutricionales como los probióticos, prebióticos, oligosacáridos, ácidos orgánicos, entre otros [9]. Estos aditivos permiten el control del establecimiento de una microbiota benéfica en los animales, además de la disminución paulatina de enteropatógenos, mejorando la producción animal y disminuyendo el riesgo para la salud humana [10-12].

Estudios realizados recientemente han demostrado que las bacterias ácido lácticas muestran características adecuadas para el control de estos microorganismos patógenos [13], sin embargo, la verificación y evaluación de estos microorganismos debe ser rigurosa con el fin de encontrar información adecuada y pertinente para los fines que se propone su utilización [14].

En respuesta a lo anterior, los organismos probióticos se han microencapsulado con el fin de aumentar la supervivencia a través del tracto gastrointestinal y con ello, garantizar una mejor colonización del organismo huésped [15], esperando que mejore la viabilidad de *L. plantarum* como agente probiótico y permita mejorar los parámetros productivos del pollo de engorde.

Por lo anterior, la investigación busca determinar el efecto del suministro de *L. plantarum* microencapsulado sobre los parámetros productivos, la respuesta inmune y la bioquímica sanguínea del pollo de engorde.

## MÉTODO

La investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio PROBIOTEC FORAPIS de la Universidad de Nariño ubicada en la ciudad de Pasto a una altura de 2600 msnm, 14°C y una humedad relativa del 65%.

### Cepa y condición de cultivo

Las condiciones para *L. plantarum* se tomaron de Orbes *et al.* [16], quienes encontraron la fase exponencial a las 14 horas con un crecimiento de  $6,6 \times 10^8$  UFC/150 mL en medio MRS. En esta investigación se usó *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, la cual se reconstituyó de acuerdo con la casa comercial.

Después de 24 h de la reconstitución, se confirmó el crecimiento y desarrollo para luego repicar con asa de argolla por el método de estrías en cajas de agar MRS comercial con azul de anilina, e incubar por 24 horas a 37°C. Todos los procedimientos de manejo de la cepa se realizaron en cámara de flujo laminar tipo II. Se evaluó la morfología macroscópica y microscópicamente con el uso de la coloración de Gram, procedimiento que fue realizado cada 15 días para verificar la viabilidad de la cepa.

### Cultivo del inóculo de *Lactobacillus plantarum*

Se inoculó una asada del cultivo en un Erlenmeyer que contenía 40 mL de caldo MRS comercial estéril. Se incubó por 24 horas a 37°C. Nuevamente se realizó un repique de 4 mL de este caldo a otros 40 mL de caldo MRS comercial y se incubó en las condiciones antes mencionadas.

Para realizar el ajuste se tomó lo descrito en Jurado-Gómez *et al.* [17] quienes tomaron en cuenta un valor de 10% v/v para el inicio de la fermentación. Después, se calculó el número de bacterias por mL. Del caldo MRS con el inóculo se tomó 1 mL y se vertió en 9 mL de solución de agua peptonada, cuando se presentó mayor población de la establecida, se adicionó caldo estéril de la siguiente manera:

$M_1$  = población o densidad celular que se debe ajustar.

$M_2$  = 0,125 densidad óptica equivalente a  $1,50 \times 10^8$  bacteria/mL. Densidad utilizada primera fermentación.

$V_1$  = 1 mL volumen proveniente del inóculo total (10/90).

$X_1$  = cantidad que contiene  $M_2$ .

$V_2$  = lo que se agrega a 1 mL para ajustar a  $1,50 \times 10^8$  bacterias/mL.

$V_3$  = 100 mL cantidad total del inóculo

$X_2$  = cantidad de caldo MRS comercial estéril que se agrega a  $V_3$  para ajustar la población el valor de  $M_2$ .

Se halla  $X_1$ :

$$\begin{array}{l} M_1 \text{ ----- } M_2 \\ M_2 \text{ ----- } X_1 \end{array}$$

$$X_1 = \frac{M_2 * V_1}{M_1} \quad (\text{Ec. 1})$$

Ahora se encuentra  $V_2$ :

$$V_2 = V_1 - X_1 \quad (\text{Ec. 2})$$

Finalmente, se obtiene el valor de  $X_2$

$$\frac{V_1 - V_2}{V_3 - X_2} = \frac{V_3 * V_2}{V_1} \quad (\text{Ec. 3})$$

El valor de  $X_2$ , es la cantidad que se debe agregar para ajustar la población.

### Microencapsulación

**Obtención de biomasa microbiana.** La cepa se conservó en crioviales (con glicerol al 1%) a una temperatura de  $-20^\circ\text{C}$ . Para su uso, se activó mediante incubación a  $37^\circ\text{C}$  en caldo MRS por 24 h en condiciones aerobias. En cada caso, la biomasa al final de la fase exponencial se recuperó por centrifugación (5000 rpm) a  $4^\circ\text{C}$  y el sobrenadante se descartó. Finalmente, las células fueron lavadas con una solución estéril de NaCl al 0,85% p/v y conservadas en refrigeración ( $6 \pm 2^\circ\text{C}$ ) hasta su uso.

**Encapsulación de *L. plantarum*.** Para este procedimiento se tuvo en cuenta la metodología descrita por Rodríguez *et al.* [21]. Se preparó un inóculo con 400 mL al 15% p/v de *L. plantarum* (60 g de Maltodextrina y 60 g de Inulina en 280 mL de inóculo bacteriano previamente ajustado) en relación 1:1 p/p, que fue agitado hasta homogenizar.

Se utilizó el equipo de secado por aspersión (Secador Spray Bilon 6000s®), con una temperatura de entrada de  $170^\circ\text{C}$  y una temperatura de salida entre  $65$  y  $67^\circ\text{C}$  con ciclo completo de 2 h y 30 min. El material microencapsulado se empacó en recipientes plásticos oscuros estériles y se almacenaron a temperatura ambiente ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) para su posterior utilización.

**Estudio del microencapsulado.** La cepa microencapsulada se evaluó en viabilidad, eficiencia y las características físicas: humedad, actividad de agua, solubilidad y humectabilidad [18]. De igual manera, se evaluaron las características estructurales, morfología y tamaño del microencapsulado. Finalmente, se evaluó la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas de acuerdo con Coppola y Gil [19]: pH 3, concentraciones de 0,1 (Ta) y 0,3% (Tb) de bilis; y concentraciones de 0,5 (Ta) y 1% (Tb) de sales biliares, más un testigo (Tc) para ambos tratamientos.

**Inoculación del alimento balanceado.** Una vez establecida la carga microbiana mediante el ajuste del inóculo, la bacteria ácido láctica se adicionó por aspersión a una concentración de 20% p/v, para luego realizar el mezclado y finalmente se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h [16]. Al final, se conservó a temperatura ambiente y en bolsas de cierre hermético.

### Evaluación en pollos de engorde

Se utilizaron 300 pollos machos de un día de edad (Ross 308 AP). Los animales se alojaron en jaulas de la clínica veterinaria Carlos Martínez Hoyos perteneciente a la Universidad de Nariño. Los pollos se mantuvieron a una temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , que disminuyó a  $21^\circ\text{C}$  al final del experimento. La humedad estuvo entre 50 y 65%. Durante los primeros 7 días, los pollos tuvieron luz las 24 h, para luego ir disminuyendo gradualmente hasta 12 h. El

experimento se realizó de los 7 a los 35 días. La primera semana fue de adaptación a las raciones experimentales, con un suministro de agua *ad libitum*.

Los animales se distribuyeron de manera aleatoria en cuatro grupos de 60 aves cada uno. El primer grupo fue alimentado con una dieta comercial sin aditivos (T0); el segundo, dieta comercial con probiótico comercial (T1, consorcio); el tercero, dieta comercial con *Lactobacillus plantarum* microencapsulado (T2) y el cuarto, dieta comercial con *Lactobacillus plantarum* sin microencapsular (T3). Las aves fueron alimentadas dos veces al día, de acuerdo con las especificaciones de la casa comercial.

Se midió el consumo de materia seca (CMS), la ganancia de peso (GP) y la conversión alimenticia (CA). De igual manera, se determinaron los metabolitos sanguíneos, triglicéridos y colesterol mediante los protocolos establecidos por los kit de Biositem® y proteínas totales mediante refractómetro.

Al final del periodo experimental se sacrificaron 10 aves por grupo y se tomaron muestras del tracto gastrointestinal, que se colocaron en formol buferado al 10% para fijación por 24 h, luego se hizo corte de duodeno, yeyuno e íleon y se colocaron en cassettes para inclusión de tejidos debidamente rotulados, se les realizó inclusión en parafina y coloración de hematoxilina y eosina. En los micropreparados se establecieron los parámetros histológicos hipertrofia e hiperplasia de las células epiteliales.

La tinción diferencial utilizada en el estudio fue la coloración con Alcian Blue, que fue ajustada a un pH de 2,5 a 3,0. Para determinar la cantidad de moco producido por las células caliciformes, las áreas se estimaron entre la capa más interna de mucosa y la más externa de la misma, de 5 campos intestinales diferentes en cada animal, se usó como lectura en objetivo de 40X usando un microscopio Nikon Eclipse 80i, cámara infinity y el software ImagePro Plus 5.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) para la descripción de alteraciones microscópicas a Jubb *et al.* [20].

Para establecer la relación cripta-vellosidad en el intestino delgado, la longitud de la vellosidad se calculó midiendo la distancia entre la punta de la vellosidad y su base, excluyendo la cripta. Este procedimiento se hizo en cada uno de los grupos experimentales.

Para histoquímica se emplearon marcadores monoclonales inmunohistoquímicos de uso en humanos CD3 y CD79a a los bloques de parafina del tracto gastrointestinal de los animales para evaluar la expresión de linfocitos T y B del tejido linfóide asociado al intestino GALT.

**Microscopia electrónica de barrido.** Las muestras del segmento conservado en alcohol al 90° se analizaron mediante la técnica del Laboratorio de Microscopia electrónica de la Universidad de Caldas, utilizando el protocolo para el procesamiento de este tipo de muestras definido por dicho Laboratorio. También, se tomó registro fotográfico para evidenciar el resultado.

## Análisis estadístico

En todas las variables se determinó estadística descriptiva. El crecimiento a diferentes concentraciones de sales biliares y bilis se evaluó mediante un diseño completamente al azar (DCA) con tres tratamientos: Ta 0,3% de sales biliares, Tb 0,5% de sales biliares y Tc crecimiento sin sales biliares (testigo), cada tratamiento contó con 8 réplicas. Para la variable bilis, se usó el mismo diseño y número de réplicas por tratamiento (Ta: bilis al 0,3%, Tb con bilis al 0,5% y Tc sin bilis).

Los parámetros zootécnicos (CMS, GP y CA) y bioquímicos (triglicéridos, colesterol y proteínas totales) se evaluaron mediante un diseño completamente al azar con 4 tratamientos (60 aves cada uno), 3 repeticiones por tratamiento (20 aves por repetición) y se muestreó de manera aleatoria a 5 animales por réplica para un total de 15 animales muestreados por tratamiento. Se determinó diferencias mediante la prueba paramétrica Tukey a un nivel de significancia del 95%.

## RESULTADOS

Los resultados de la microencapsulación de *Lactobacillus plantarum* se pueden observar en el cuadro 1. Los valores indican una buena viabilidad del microencapsulado; al respecto, Rodríguez *et al.* [18] encontraron porcentajes de 84 y 96% de viabilidad para *L. rhamnosus* y *L. casei* respectivamente. Por otra parte, Montes [21] tuvo una viabilidad de 46,53% para *L. casei*, valor más bajo al encontrado en esta investigación.

La eficiencia se encuentra por debajo de lo reportado por Chen *et al.* [22] con valores entre 96,5 y 97,85%. Sin embargo, Parra [23] indica que este parámetro se ve influenciado por factores como la masa molecular del polímero, tamaño y microporosidad de la esfera y características físico-químicas del principio activo, factores que podrían explicar los resultados obtenidos.

Para el caso de la humedad, el valor encontrado es mayor al de otros autores [24-25], lo que demuestra que es necesario trabajar más sobre este parámetro. Al respecto, Dinkçi *et al.* [26] mencionan que la humedad en un microencapsulado debe mantenerse entre 3,5 y 4,0%, ya que puede presentar problemas de conservación durante su vida útil.

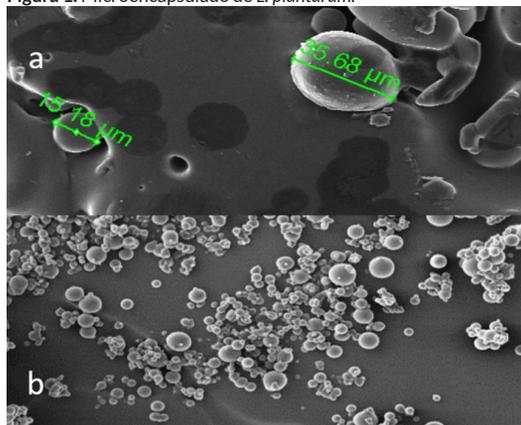
La humectabilidad tiene un menor tiempo, en comparación al estudio de Montes [21]; este autor menciona que la lenta rehidratación tiene un efecto positivo sobre la viabilidad de las cepas microencapsuladas, lo que sugeriría que se necesita mejorar su contextura con otros materiales microencapsulantes.

El tamaño y la morfología se observan en las figuras 1. En cuanto al tamaño de partícula se encontraron valores de 15,18 a 35,68  $\mu\text{m}$ . Los estudios muestran que el tamaño del microencapsulado influye sobre la viabilidad de la bacteria [27]. Ramos *et al.* [27] manifiesta que tamaños entre los 2 y 100  $\mu\text{m}$  se consideran adecuados para una microencapsulación, ya que si son demasiados grandes dificulta la liberación de la cepa y si son muy pequeños,

**Cuadro 1.** Parámetros del microencapsulado de *Lactobacillus plantarum*.

Factor	Valor
Viabilidad	83,3%
Eficiencia	88,4%
Humedad relativa	7,79%
Actividad de agua	0,4
Humectabilidad	1:56 min
Solubilidad	96%

**Figura 1.** Microencapsulado de *L. plantarum*.



A: tamaño, b: morfología.

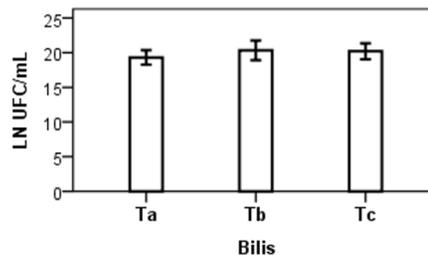
su protección no será efectiva. Por ello, los resultados encontrados tienen un efecto positivo sobre la microencapsulación de *L. plantarum*.

Para la simulación de condiciones gastrointestinales, el crecimiento, a pH 3 por 24 h, mostró un crecimiento de  $6,4 \times 10^9$ , valor indicador de que la cepa láctica muestra resistencia a las condiciones ácidas; si se tiene en cuenta que el pH gastrointestinal de las aves puede llegar hasta 3 o incluso menos, la bacteria tiene altas posibilidades de sobrevivir microencapsulada y con ello atravesar la porción inicial de tracto digestivo [28].

Para el caso de bilis y sales biliares los resultados se pueden observar en la figura 2. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ). Esto demuestra que el crecimiento en condiciones gastrointestinales simuladas no se ve afectado. Al respecto, estudios realizados por Chen *et al.* [29] indican que las bacterias ácido lácticas microencapsuladas presentan mejor crecimiento en condiciones de pH alto (básico), debido a la capa protectora que las recubre, de esta manera se garantiza la viabilidad de la cepa, para su posterior liberación en un ambiente menos agresivo.

Los resultados de los parámetros productivos se puede observar en el cuadro 2, encontrando diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ) y se observa un mayor crecimiento en los tratamientos probióticos comercial y *L. plantarum* sin microencapsular.

Figura 2. Análisis de bilis y sales biliares.



Cuadro 2. Parámetros productivos, bioquímicos, microbiológicos, e histológicos.

Parámetros productivos				
Variable	T0	T1	T2	T3
GP (g)	181,17± 23 <sup>b</sup>	240,34 30± <sup>a</sup>	190,68± <sup>b</sup>	276,39± 32 <sup>a</sup>
Consumo (g)	4403,0± 58 <sup>b</sup>	4313,3± 59 <sup>b</sup>	4548,0± 34 <sup>a</sup>	4773,7± 59 <sup>a</sup>
CA	4,39± 0,3 <sup>b</sup>	3,21± 0,1 <sup>c</sup>	5,42± 0,2 <sup>a</sup>	4,13± 0,4 <sup>b</sup>
Parámetros bioquímicos				
Variable	T0	T1	T2	T3
Colesterol (mg/dL)	158,8± 1,2 <sup>b</sup>	161,5± 2,1 <sup>c</sup>	202,8± 3 <sup>a</sup>	164,4± 1,4 <sup>b</sup>
Triglicéridos (mg/dL)	116,0± 4,7 <sup>b</sup>	115,2± 6,2 <sup>b</sup>	92,2± 7,2 <sup>c</sup>	151,0± 6,3 <sup>a</sup>
Proteína total (g/dL)	3,48± 0,9 <sup>a</sup>	3,63± 0,6 <sup>a</sup>	3,80± 0,7 <sup>a</sup>	3,50± 0,6 <sup>a</sup>
Parámetros microbiológicos				
Variable	T0	T1	T2	T3
Lactobacillus	95000	284000	112800	200500
E. coli	0	0	0	0
Coliformes	666,7	55666,7	500	0
Conteo en tinciones				
Variable	T0	T1	T2	T3
Histoquímica	367	340	280	342
Caliciformes	1476	1002	1356	1290

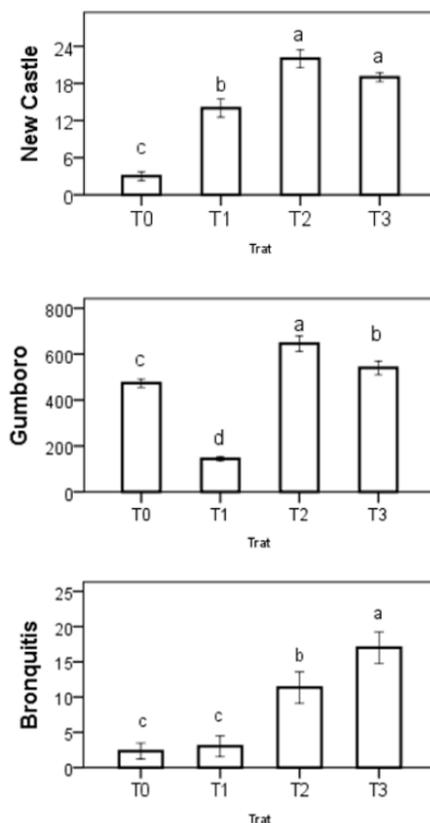
Estos resultados indican que el suministro de probióticos en la alimentación de pollos de engorde muestra ser benéfico para los rendimientos productivos. En cuanto al consumo, se encontraron resultados similares y la conversión alimenticia muestra como el tratamiento con probiótico comercial (T2) tienen mayor eficiencia en la transformación del alimento.

A pesar de observarse diferencias entre los parámetros bioquímicos, los valores se encuentran dentro del rango normal de la especie, por lo que no se puede tener información concluyente sobre los efectos de los organismos probióticos sobre los parámetros bioquímicos evaluados.

Como era de esperarse, los parámetros microbiológicos demostraron un incremento de la población microbiana en los tratamientos con el suministro de probióticos, ya sea en consorcio (probiótico comercial) como cepas individuales (*L. plantarum*). Al respecto, Manes-Lazaro *et al.* [30] mencionan que la presencia de organismos probióticos en el tracto gastrointestinal de las aves tiene un efecto benéfico para su salud. Entre estos beneficios se encuentra la exclusión competitiva, el antagonismo hacia otras cepas, especialmente patógenas la estimulación inmune del hospedero y producción de biocinas [31]. Con lo anterior, se puede determinar que algunas de las mejoras en los parámetros zootécnicos pueden ser el resultado de la correcta colonización de los probióticos en el tracto de los pollos de engorde evaluados.

Los resultados para títulos se observan en las figuras 3. Se encontró una mayor seroconversión para los tratamientos con administración de *L. plantarum* (T2 y T3), lo que demuestra un efecto positivo de la bacteria. En el caso de Gumboro y bronquitis muestran resultados similares, ya que T2 y T3 presentan los mayores valores de seroconversión.

Figura 3. Títulos inmunológicos para New Castle, Gumboro y Bronquitis.



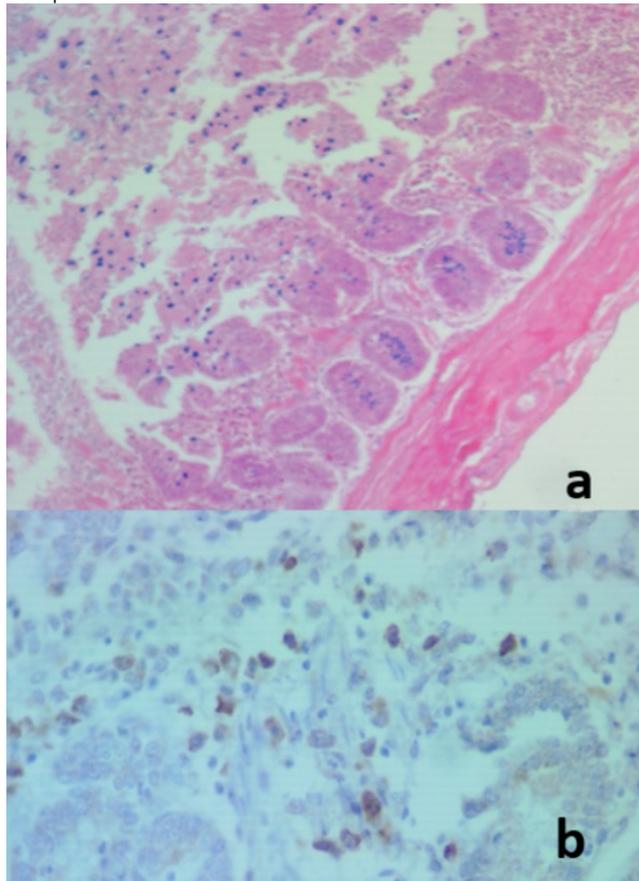
Los resultados demuestran que es una ventaja la utilización de *L. plantarum* en la estimulación del sistema inmunitario de los pollos de engorde; factor que tendrá efectos benéficos para el sistema de producción.

En otros estudios se ha demostrado que la utilización de cepas probióticas permite la estimulación del sistema inmunológico del animal huésped, estos efectos se han observado en aves y cerdos, lo que corrobora los resultados obtenidos. Sin embargo, se necesita continuar con la investigación, ya que este tipo de resultados aún no son concluyentes para la comunidad científica y se hace necesario realizar otro tipo de pruebas para determinar su efectividad [32-33].

Los resultados para coloración e histoquímica de células caliciformes se pueden observar en la figura 4 y cuadro 2. Se encontró que las células caliciformes fueron marcadas con la técnica Alcian blue y con ello se puede realizar conteo de estas. De igual manera, la inmunomarcación fue positiva para los tejidos de pollos de engorde, lo que se convierte en una herramienta más para investigar los efectos probióticos en este tipo de animales.

Se observa que los mayores valores para ambas variables se pueden observar en el tratamiento T0 (sin probiótico). Estos resultados no se pueden explicar de manera adecuada, dado que se esperaría que los tejidos de animales con administración de probióticos debieran tener el mayor conteo, sin embargo, dado que la técnica recién inicia en la identificación de células de pollo de engorde, se hace necesario continuar investigando para obtener información más contundente.

**Figura 4.** Inmunohistoquímica en intestino delgado coloración de Alcian Blue para células caliciformes.



a: Tinción de Alcian blue para caliciformes; b: inmunohistoquímica.

## CONCLUSIONES

Los resultados indican que la administración de *Lactobacillus plantarum* tiene efectos positivos sobre los parámetros productivos ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia. Aunque el suministro muestra diferencias en los parámetros bioquímicos, estos valores están dentro del rango para la especie. De igual manera, se incrementan la respuesta inmune del hospedero. Finalmente, el método de microencapsulado y la matriz usada para recubrir la cepa mantiene la viabilidad de la bacteria.

## REFERENCIAS

- [1] NKUKWANA, T. Global poultry production: Current impact and future outlook on the South African poultry industry. *South African Journal of Animal Science*, v. 48, n. 5, 2018, p. 869-884.  
[10.4314 / sajas.v48i5.7](https://doi.org/10.4314/sajas.v48i5.7)
- [2] SELL-KUBIAK, EWA; WIMMERS, KLAUS; REYER, HENRY; SZWACZKOWSKI, TOMASZ. Genetic aspects of feed efficiency and reduction of environmental footprint in broilers: a review. *Journal of applied genetics*, v. 58, n. 4, 2017, p. 487-498.  
[10.1007/s13353-017-0392-7](https://doi.org/10.1007/s13353-017-0392-7)
- [3] GAO, PENGFEI; MA, CHEN; SUN, ZHENG; WANG, LIFENG; HUANG, SHI; SU, XIAQUAN; ZHANG, HE-PING. Feed-additive probiotics accelerate yet antibiotics delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken. *Microbiome*, v. 5, n. 1, p. 91.  
<http://10.1186/s40168-017-0315-1>
- [4] AGUNOS, AGENES; LÉGER, DAVID F.; CARSON, CAROLEE A.; GOW, SHERYL P.; BOSMAN, ANGELINA; IRWIN, REBECCA J.; REID-SMITH, RICHARD J. Antimicrobial use surveillance in broiler chicken flocks in Canada, 2013-2015. *PLoS one*, v. 12, n. 6, 2017, p. e0179384.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179384>
- [5] COYNE, LUC; ARIEF, RIANA; BENIGNO, CAROLYN; GIANG, VO-NGAN; HUONG, LUU-QUYNH, JEAMSRI-PONG, SAHARUETAI; KALPRAVIDH, WANTANEE; MCGRANE, JAMES; PADUNGTOD, PAWIN; PATRICK, IAN; SCHOONMAN, LUUK; SETYAWAN, ERRY; SUKARNO, ADY-HARJA; SRISAMRAN, JUTANAT; NGOC, PHAM-THI; RUSHTON, JONATHAN. Characterizing Antimicrobial Use in the Livestock Sector in Three South East Asian Countries (Indonesia, Thailand, and Vietnam). *Antibiotics*, v. 8, n. 1, 2019, p. 33-45.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics8010033>
- [6] WU, ZINPING. Antimicrobial use in food animal production: situation analysis and contributing factors. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, v. 5, n. 3, 2018, p. 301-311.  
<https://doi.org/10.15302/J-FASE-2018207>
- [7] HANG- PHAM, THI-THU; ROSSI, PIERRE; KHOA-DINH, HOANG-DANG; ANH-PHAM, NGOC-TU; ANH-TRAN, PHUONG; MUI-HO, OTHI-KHAI; TUC-DINH, QUOC; DE ALENCASTRO, LUIZ-FELIPPE. Analysis of antibiotic multi-resistant bacteria and resistance genes in the effluent of an intensive shrimp farm (Long An, Vietnam). *Journal of environmental management*, v. 214, 2018, p. 149-156.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.02.089>
- [8] GADDE, W.; KIM, W.; ILLEHOJ, HYUN S. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. *Animal health research reviews*, v. 18, n. 1, 2018, p. 26-45.  
<https://doi.org/10.1017/S1466252316000207>
- [9] PLOEGMAKERS, I.B.; OLDE-DAMINK, S.W.; BREUKINK, S.O. Alternatives to antibiotics for prevention of surgical infection. *British Journal of Surgery*, v. 104, n. 2, 2017, p. e24-e33.  
<https://doi.org/10.1002/bjs.10426>
- [10] FORD, ALEXANDER C.; HARRIS, LUCINDA, A.; LACY, BRIAN E.; QUIGLEY, EAMONN M.; MOAYYEDI, PAUL. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of prebiotics, probiotics, symbiotics and antibiotics in irritable bowel syndrome. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 48, n. 10, 2018, p. 1044-1060.  
<https://doi.org/10.1111/apt.15001>

- [11] MARKOWIAK, PAULINA; ŚLIŹEWSKA, KATARZYNA. The role of probiotics, prebiotics and symbiotics in animal nutrition. *Gut pathogens*, v. 10, n. 1, 2018, p. 21-38.  
<http://10.1186/s13099-018-0250-0>
- [12] DOWARAH, RUNJUN; VERMA, A.K.; AGARWAL, NEETA. The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review. *Animal Nutrition*, v. 3, n. 1, 2017, p. 1-6.  
<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.11.002>
- [13] WANG, YONGWEI; DONG, ZHENGLIN; SONG, DAN; ZHOU, HANG; WANG, WEIWEI; MIAO, HAIJIANG; LI, AIKE; LI, WANG. Effects of microencapsulated probiotics and prebiotics on growth performance, antioxidative abilities, immune functions, and caecal microflora in broiler chickens. *Food and agricultural immunology*, v. 29, n. 1, 2018, p. 859-869.  
<https://doi.org/10.1080/09540105.2018.1463972>
- [14] BYAKIKA, STELLAH; MUKISA, IVAN-MUZIRA; BYARUHANGA, YUSUF-BYENKYA; MUYANJA, CHARLES. review of criteria and methods for evaluating the probiotic potential of microorganisms. *Food Reviews International*, v. 5, n. 2, 2019, p. 1-40.  
<https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1584815>
- [15] GADDE, U; KIM, W.H.; OH, S.T; LILLEHOJ, HYUN. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. *Animal health research reviews*, v. 18, n. 1, 2017, p. 26-45.  
<https://doi.org/10.1017/S1466252316000207>
- [16] JURADO-GÁMEZ, HENRY; ORBES-VILLACORTE, ADRIANA-ELIZABETH; MESÍAS-PANTOJA, LAURA-NATHALY. Evaluation in vivo of *Lactobacillus plantarum* with probiotic characteristics by blood chemistry, immunohisto química and electron microscopy in *Cavia porcellus*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, v. 15, n. 2, 2017, p. 11-21.  
[http://dx.doi.org/10.18684/BSAA\(15\)11-21](http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(15)11-21)
- [17] JURADO-GÁMEZ, HENRY; JARRÍN-JARRÍN, VERONICA; BUSTAMANTE-MELO, JESÚS. Efecto bioconservante del sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus lactis* en lomo de cerdo (*Longissimus dorsi*). *Revista de Medicina Veterinaria*, v. 35, 2017 p. 159-173.  
<http://dx.doi.org/10.19052/mv.4399>
- [18] RODRÍGUEZ, H; JIMENEZ, T. La microencapsulación. *Revista veterinaria del Perú*, v. 34, n. 2, 2018, p. 34-41.
- [19] COPPOLA-MENEZES, MARIO; GIL-TURNES, CARLOS. Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural*, v. 34, n. 4, 2004, p. 1297-1303.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000400056>
- [20] JUBB, K.; KENNEDY, PETER; PALMER, NIGER. *Pathology of Domestic Animals*. 6 ed. Washington (USA): Elsevier, Inc. 2016. 670 p.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2823-6.X5001-5>
- [21] MONTES, LUZ; RODRÍGUEZ-BARONA, SNEYDER; GIRALDO, GLORIA. Encapsulación de alimentos probióticos mediante liofilización en presencia de prebióticos. *Información tecnológica*, v. 27, n. 6, 2010, p. 135-144.  
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642016000600014>
- [22] CHEN, HAIYAN; LI, XIANGYI; LIU, BIENGJIE; MENG, XIANHONG. Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, v. 29, 2017, p. 248-255.  
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.015>
- [23] PARRA-HUERTAS, RICARDO-ADOLFO. Revisión: microencapsulación de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, v. 63, n. 2, 2010, p. 5669-5684.
- [24] SAMEDI, LESLY; CHARLES, ALBERT-LINTON. Viability of 4 probiotic bacteria microencapsulated with arrowroot starch in the simulated Gastrointestinal Tract (GIT) and yoghurt. *Foods*, v. 8, n. 5, 2019, p. 175-183.  
<https://doi.org/10.3390/foods8050175>
- [25] LIAO, LIANGKUN; XIAOYI,WEI; GONG, XIAO; LI, JIHUA; HUANG, TAO; XIONG, TAO. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and *in vitro* digestion. *LWT-food science and technology*, v. 82, 2017, p. 82-89.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.065>

- [26] DINKÇI, NAYIL; AKDENIZ, VILDAL; AKALIN, SIBEL A. Survival of probiotics in functional foods during shelf life. *Food Quality and Shelf Life*, v. 201, 2019, p. 345-350.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817190-5.00006-9>
- [27] RAMOS, PHILIPPE E.; CERQUEIRA, MIGUEL A.; TEIXEIRA, JOSÉ A.; VICENTE, ANTONIO A. Physiological protection of probiotic microcapsules by coatings. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 58, n. 11, 2018, p. 1864-1877.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1289148>
- [28] MABELEBELE, M; NORRIS, D.; BROWN, D; GININDZA, M.M.; NGAMBI, J.W. Breed and sex differences in the gross anatomy, digesta pH and histomorphology of the gastrointestinal tract of *Gallus gallus domesticus*. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 19, n. 2, 2017, p. 339-346.  
<https://doi.org/10.1590/1806-9061-2016-0275>
- [29] MIN-JU, CHEN; HSINYU, TANG; MING-LUNG, CHIANG. Effects of heat, cold, acid and bile salt adaptations on the stress tolerance and protein expression of kefir-isolated probiotic *Lactobacillus kefirifaciens* M1. *Food microbiology*, v. 66, 2017, p. 20-27.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.020>
- [30] MANES-LAZARO, R.; VAN DIEMEN, P.M.; PIN, C.; MAYER, M.J.; STEVENS, M.P. NARBAD, A. Administration of *Lactobacillus johnsonii* F19785 to chickens affects colonisation by *Campylobacter jejuni* and the intestinal microbiota. *British poultry science*, v. 58, n. 4, 2017, p. 373-381.  
<https://doi.org/10.1080/00071668.2017.1307322>
- [31] HOSSAIN, M.I.; SADEKUZZAMAN, MOHAMMAD; SAN-DO, HA. Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: a review. *Food research international*, v. 100, 2017, p. 63-73.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.077>
- [32] MAJIDI-MOSLEH, A.; SADEGHI, A.A.; MOUSAVI, S.N.; CHAMANI, M.; ZAREI, A. Ileal MUC2 gene expression and microbial population, but not growth performance and immune response, are influenced by in ovo injection of probiotics in broiler chickens. *British poultry science*, v. 58, n. 1, 2017, p. 40-45.  
<https://doi.org/10.1080/00071668.2016.1237766>
- [33] INATOMI, TAKIO; AMATATSU, MAASAKI; ROMERO-PÉREZ, GUSTAVO-ADOLFO; INOUE, RYO; TSUKAHARA, TAKAMITSU. Dietary probiotic compound improves reproductive performance of porcine epidemic diarrhea virus-infected sows reared in a Japanese commercial swine farm under vaccine control condition. *Frontiers in Immunology*, v. 8, 2017, p. 1877-1883.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01877>