



Universidad
Católica de
Valencia
San Vicente Mártir

TFG

TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

Potencial de la glándula uropigial como fuente para obtener cepas probióticas para uso en avicultura

Alumno: Ana M^a Torrecillas Serrano
Tutor UCV: Dra. Alba Rodríguez Mengod
Tutor externo: Dr. Manuel Zúñiga Cabrera
Cotutor externo: Dr. Vicente Monedero García
Curso 2019/2020



**Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales**
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutores Manolo y Vicente por darme esta oportunidad donde he aprendido mucho, por dedicarme su tiempo y necesaria ayuda. También a Cristina, por haberme apoyado siempre, haber estado cuando lo necesitaba y por la paciencia a enseñarme tantas cosas. Gracias por vuestro esfuerzo y gran dedicación.

Agradecer a Alba por haberme tutorizado, guiado y ayudado de la mejor manera posible durante este periodo de 5 meses.

Por último, quería dar las gracias a mi familia y amigos por su apoyo incondicional y quienes siempre han confiado en mí.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1.- MORTALIDAD POR COLIBACILOSIS EN POLLITOS RECIÉN ECLOSIONADOS	1
2.- PROBLEMÁTICA DEL USO DE ANTIBIÓTICOS EN GANADERÍA.....	3
3.- UTILIZACIÓN DE PROBIÓTICOS COMO ALTERNATIVA NATURAL	5
3.1- <i>Fuente de probióticos, la glándula uropigial.</i>	7
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y MÉTODOS	11
1.- CULTIVO DE MICROORGANISMOS	11
1.1- <i>Cepas lácticas</i>	11
1.2- <i>Escherichia coli</i>	12
2.- IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS.....	13
3.- EFECTO ANTAGONISTA DE LAS CEPAS AISLADAS	15
3.1- <i>Obtención de los sobrenadantes</i>	15
3.1.1 Inhibición del crecimiento	15
3.1.2 Criterio de selección de cepas	16
RESULTADOS	17
1.- IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS	17
2.- INHIBICIÓN DE LA CEPA PATÓGENA.....	21
2.1- <i>Crecimiento cultivos</i>	21
2.1.1- Crecimiento cepas glándula uropigial.....	21
2.1.2- Crecimiento <i>E. coli</i>	21
2.2- <i>Sobrenadante sin neutralizar</i>	22
2.3- <i>Sobrenadante neutralizado</i>	25
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIÓN	33
LÍNEAS FUTURAS	35
BIBLIOGRAFÍA	37

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN UNA BACTERIA.....	4
FIGURA 2. LOCALIZACIÓN GLÁNDULA UROPIGIAL EN AVES.	8
FIGURA 3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 0,8%..	18
FIGURA 4. GÉNERO DE LAS BACTERIAS DE LA GLÁNDULA UROPIGIAL.	20
FIGURA 5. CRECIMIENTO DE LAS CEPAS (ID: 209-255) EN MRS LÍQUIDO.....	21
FIGURA 6. CURVA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA E027 DE <i>E. COLI</i>	22
FIGURA 7. CORRELACIÓN PH.....	23
FIGURA 8. DENSIDAD ÓPTICA MÁXIMA (DOMAX) (C) ALCANZADA POR <i>E.COLI</i> CULTIVADA EN LOS SOBRENADANTES AL 50%, CON PH NEUTRO.....	26
FIGURA 9. TASA DE CRECIMIENTO (MUE) DE <i>E.COLI</i> CULTIVADA EN LOS SOBRENADANTES AL 50%, CON PH NEUTRO..	26

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PROCEDENCIA DE LAS CEPAS (ID) DE LA GLÁNDULA UROPIGIAL. 12	
TABLA 2. IDENTIFICACIÓN CEPAS DE LA GLÁNDULA UROPIGIAL..	19
TABLA 3. CONDICIONES DE REFERENCIA DE LA CEPA E027 DE <i>E. COLI</i>	22
TABLA 4. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO DE <i>E. COLI</i> CON RESPECTO AL VALOR DE REFERENCIA.	24
TABLA 5. INHIBICIÓN DE <i>E. COLI</i> POR LOS SOBRENADANTES NEUTRALIZADOS DE LAS CEPAS (ID)..	27

Resumen

La bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) tiene una gran importancia como principal causa de colibacilosis y mortalidad en los pollitos de engorde de la industria avícola. Hasta ahora esta enfermedad se ha tratado con antibióticos de amplio espectro, pero finalmente este procedimiento ha sido prohibido debido a la gran preocupación sobre el creciente uso de antibióticos en las producciones ganaderas y los posibles efectos sobre la salud humana, como la diseminación de resistencias a patógenos. Esta retirada ha causado un aumento de las colisepticemias producidas por *Escherichia coli* patógena aviar (APEC). Por ello, la investigación se ha centrado en la investigación del uso de probióticos como productos alternativos para inhibir el crecimiento de *E. coli*, ya que se ha demostrado que los probióticos poseen capacidad de reducir la incidencia de ciertas enfermedades infecciosas.

Se exploró la glándula uropigial de diversas aves como fuente de cepas probióticas que tuviesen un efecto antagonista ante la incidencia de colibacilosis y la mortalidad de los pollitos recién eclosionados.

Para ello se identificaron las cepas aisladas de la glándula resultando en su mayoría ser *Enterococcus*, y se estudió la actividad antagonista frente cepas patógenas de *E. coli*, donde se obtuvo que las bacterias que producen ácido láctico en grandes cantidades inhiben *E. coli* en un 15% o más, pero a su vez estas bacterias no producen metabolitos secundarios con suficiente capacidad inhibitoria.

Se ha determinado que la glándula uropigial no tiene un gran potencial como fuente de cepas probióticas con capacidad de reducir la incidencia de colibacilosis y la mortalidad de los pollitos recién eclosionados.

Palabras clave: *Escherichia coli*; APEC; pollos de engorde; resistencia a antibióticos; probióticos; efecto antagonista.

Abstract

Escherichia coli (*E. coli*) is a significant cause of colibacillosis and mortality in broiler chickens in the poultry industry. Until now this disease has been treated with broad-spectrum antibiotics, but finally this procedure has been prohibited due to the great concern about the increasing use of antibiotics in livestock production and the possible effects on human health, such as the dissemination of resistances among pathogens. This withdrawal has led to an increase in the number of colisepticemia produced by the avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Research has focused on investigating the use of probiotics as alternative products to inhibit the growth of *E. coli*, because probiotics have been shown to have the ability to reduce the risk of certain infectious diseases.

The uropigial gland of several birds was explored as a source of probiotic strains that have the ability to reduce the incidence of colibacillosis and mortality in newly hatched chicks.

To this end, the strains isolated from the gland were identified, most of them being *Enterococcus*, and the antagonistic activity against pathogenic strains of *E. coli* was studied. Results obtained showed that the bacteria that produce lactic acid in large quantities inhibit *E. coli* by 15% or more, but at the same time these bacteria do not produce secondary metabolites with sufficient inhibitory capacity.

It has been determined that the uropigial gland does not have great potential as a source of probiotic strains with the ability to reduce the incidence of colibacillosis and mortality in newly hatched chicks.

Keywords: *Escherichia coli*; APEC; antibiotic resistant; broilers; probiotics; antagonist effect.

Introducción

1.- Mortalidad por colibacilosis en pollitos recién eclosionados

En los últimos años el aumento de la mortalidad de los pollos de engorde debido a la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) está cobrando especial relevancia, afectando significativamente a la producción agrícola.

Escherichia coli es una bacteria anaerobia facultativa, gram negativa, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y al género *Escherichia*. Tiene forma de bastón, cilíndrica con extremos redondeados con un diámetro de 1.1–1.5 μm y una longitud de 2.0 - 6.0 μm , pueden ser móviles con flagelos o inmóviles (Scheutz & Strockbine, 2015). Es una bacteria comensal del tracto gastrointestinal del ser humano y animales, formando parte de la microbiota intestinal aunque también causa enfermedades diarreicas y extraintestinales. Las cepas patogénicas de *E. coli* causan mucha morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Awad *et al.*, 2020; Croxen *et al.*, 2013; Scheutz & Strockbine, 2015; Subedi *et al.*, 2018)

Las cepas patógenas de *E. coli* se han estudiado en humanos, animales, alimentos y el medio ambiente. Estas cepas patogénicas se han clasificado según el factor genético que define su virulencia y que contribuye al cuadro clínico asociado, definiendo a diferentes tipos patogénicos, conocidos como patotipos o virotipos. Los brotes son comunes en los países desarrollados y en desarrollo, y a veces tienen consecuencias fatales. La mayoría de los patotipos conllevan un problema importante para la salud pública, ya que tienen bajas dosis infecciosas y se transmiten a través de medios ubicuos, como los alimentos y el agua. Uno de los grupos importantes es *E. coli* extraintestinal (ExPEC), que consta de: *E. coli* patógena aviar (APEC), meningitis neonatal *E. coli* (NMEC) y *E. coli* uropatógena (UPEC) (Croxen *et al.*, 2013). La capacidad patogénica de *E. coli* se ve facilitada por una amplia gama de factores de virulencia. Según los criterios genéticos, la patogenicidad de las cepas APEC se determina por la presencia de genes de virulencia, los más comunes; sistema de captación de hierro (*iutA*), proteína del aumento de la supervivencia en el suero (*iss*), fimbria-P (*papC*), aerobactina (*iucD*), hemaglutinina sensible a la temperatura (*tsh*), proteína de captura de hierro (*irp-2*), proteasa de la membrana externa (*ompT*),

hemolisina y producción de vesículas de membrana externa (*hlyF*), sideróforo receptor de la membrana externa (*iroN*), los genes presentes en plásmidos que codifican la colicina V (*cva/cvi*) y toxina enteroagregativa (*astA*) (Ewers *et al.*, 2005; Subedi *et al.*, 2018; Varga *et al.*, 2018).

E. coli es parte de la microbiota intestinal habitual de las aves y también está comúnmente presente en la faringe y la tráquea. Pero, ciertas cepas patógenas como APEC afectan a otros órganos de las aves causándoles pericarditis, saculitis aérea, perihepatitis, peritonitis y otras enfermedades extraintestinales, denominadas colectivamente como colibacilosis, siendo la causa más común de mortalidad en la primera semana de vida de los pollos de engorde. La colibacilosis puede ser localizada o sistémica y produce pérdidas significativas en las industrias avícolas (Guabiraba & Schouler, 2015; Poulsen *et al.*, 2017; Subedi *et al.*, 2018).

Las infecciones de *E. coli* se dan sobre todo durante el proceso de incubación comercial. La incubación de los huevos comprende 21 días y se realiza en dos etapas, la primera etapa dura 18 días y se realiza en incubadoras donde se controlan las condiciones ambientales: temperatura, humedad y calidad del aire, por lo que hay poca carga microbiana en el ambiente. Los últimos 3 días de incubación se desarrollan en las nacedoras. Al abrirse la cascara del huevo se libera una gran carga de materia orgánica en el ambiente que, junto con las condiciones ambientales, favorece el crecimiento de bacterias, algunas de ellas patógenas para el pollito. Esto facilita la aparición de colibacilosis tempranas y problemas de osteomielitis y alteraciones óseas.

Se ha demostrado que esta problemática se agrava a medida que las gallinas reproductoras son más viejas, pues con la edad se reduce la calidad de la cáscara. Esta tiene una gran importancia para la salud del pollito, ya que la falta total o parcial de la cutícula, el grosor de la cáscara y el aumento del número de poros se relaciona con una mayor probabilidad de contaminación del huevo, pudiendo pasar de contaminación externa a interna del huevo.

2.- Problemática del uso de antibióticos en ganadería

Los antibióticos son uno de los grandes avances de la medicina, suponiendo un beneficio en el tratamiento y control de enfermedades infecciosas, con un papel muy importante en el desarrollo y avance de la industria avícola, implementándose en la alimentación animal como promotores de crecimiento y en la prevención de enfermedades (Ouwehand *et al.*, 2016; Subedi *et al.*, 2018).

Sin embargo, su utilización en ganadería ha creado varios efectos adversos, como cambios en la microbiota intestinal, la presencia de antibióticos residuales en el medio ambiente y en productos alimenticios, y, la consecuencia más grave desde el punto de vista de la salud pública, la diseminación de resistencias a antibióticos en microorganismos (Miles *et al.*, 2006). En la actualidad, diversos microorganismos han acumulado resistencias a numerosos o todos los antibióticos utilizados, constituyendo un desafío en el tratamiento de enfermedades zoonóticas y llevando a una situación peligrosa en los sectores de la salud por su transmisión de animales a humanos. Los mecanismos de resistencia son variados, incluyendo la modificación o eliminación de los receptores, mecanismos de expulsión del antimicrobiano o de degradación del mismo (Figura 1) (Ouwehand *et al.*, 2016; Subedi *et al.*, 2018). Por ello, pese a los efectos beneficiosos como la mejora de la tasa de crecimiento, reducción de la mortalidad y el aumento de la resistencia contra enfermedades, se debe reducir el uso inapropiado de antibióticos, tanto en aplicaciones humanas como veterinarias (Ouwehand *et al.*, 2016).

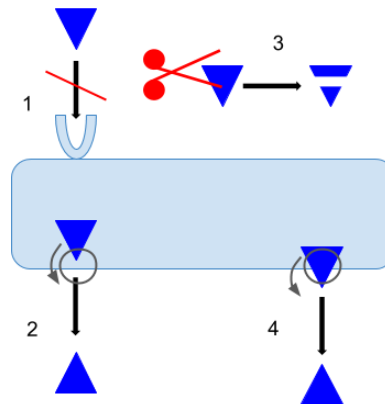


Figura 1. Representación esquemática de la resistencia a los antibióticos en una bacteria: (1) el objetivo falta o ha mutado y no es adecuado para el antibiótico, (2) un exportador existente también puede expulsar un antibiótico, (3) una enzima específica puede inactivar los antibióticos y (4) un transportador específico puede expulsar el antibiótico de la célula. El triángulo azul (~) representa el antibiótico (Elaborada a partir del artículo (Ouwehand *et al.*, 2016)).

La Unión Europea prohibió en 2006 el uso de antibióticos con fines no terapéuticos, y la United States Food and Drug Administration (FDA) más tarde, en 2015 (Dibner & Richards, 2005).

La industria avícola hasta ese momento paliaba el problema de las infecciones con el uso de antibióticos de amplio espectro al día de vida e incluso en el embrión a los dieciocho días de incubación, hasta que este tipo de tratamiento comenzó a ser cuestionado y finalmente prohibido por el aumento de uso de antibióticos en producciones ganaderas y los posibles efectos sobre la salud humana. Todo esto ha causado que aumenten las colisepticemias tempranas, y la mortalidad en la industria ganadera.

3.- Utilización de probióticos como alternativa natural

La investigación de las últimas décadas se ha centrado en el desarrollo de productos alternativos a los antibióticos para combatir la incidencia de enfermedades, con el objetivo de encontrar un sustituto natural, ecológico, económico y eficaz a los que se han estado utilizando normalmente para reducir la incidencia de colibacilosis y la mortalidad de los pollitos recién eclosionados.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la OMS han desarrollado la definición de probiótico como "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped". Pueden contener una o varias cepas de microorganismos, y se pueden suministrar tanto de forma individual como en combinación con otros aditivos (Hotel & Cordoba, 2001).

El término probiótico hace referencia a un grupo heterogéneo de microorganismos, que incluye principalmente a especies de los órdenes *Bifidobacteriales*, y *Lactobacillales* (Aznar & Zúñiga, 2000) y a ciertas levaduras (*Saccharomyces spp.*).

Las bifidobacterias, pertenecientes al orden *Bifidobacteriales*, son bacilos de 2–5µm de longitud, pleomórficas, gram positivas y anaerobias. Algunas especies pueden crecer en presencia de oxígeno si también hay CO₂. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 35-39°C.

En cuanto a las bacterias del orden *Lactobacillales*, en su mayor parte son bacilos o cocos gram positivos, anaerobios facultativos, poseen dos tipos de vías metabólicas, cabe destacar que en ambas fermentan azúcares, la vía homofermentativa, en la que sólo se produce ácido láctico, y la vía heterofermentativa en la que se forma ácido láctico, etanol y CO₂ (Aznar & Zúñiga, 2000).

Diversos estudios han respaldado el beneficio del uso de probióticos para la salud de la microbiota intestinal y las afecciones gastrointestinales, como la diarrea infecciosa, la diarrea asociada a antibióticos, la diarrea del viajero, el tránsito intestinal lento, el síndrome del intestino irritable, el dolor abdominal, la hinchazón y la colitis ulcerosa. Son uno de los suplementos nutricionales más consumidos (Abid & Koh, 2019;

Blajman *et al.*, 2015). También hay estudios que demuestran un impacto positivo de los probióticos en el riesgo cardiovascular, en la prevención de alergias y en las infecciones bacterianas específicas, como las causadas por *Helicobacter pylori* y *Clostridium difficile* (Abid & Koh, 2019). Algunos probióticos poseen la capacidad de limitar el contacto directo de las bacterias patógenas con el epitelio, debido a la exclusión competitiva de nutrientes y por proporcionar un ambiente que limita su crecimiento (Tarradas *et al.*, 2020).

Los tratamientos con antibióticos a menudo se asocian con la aparición de disbiosis y la reconstitución de la microbiota en ocasiones puede ser lenta e incompleta. Diversos estudios indican que los probióticos pueden constituir un tratamiento posterior para la disbiosis asociada al tratamiento con antibióticos (Suez *et al.*, 2018).

Se ha demostrado que algunos probióticos poseen actividad antimicrobiana, por lo que podrían ser una alternativa eficiente para la prevención de algunas enfermedades animales. Las bacterias lácticas en particular generan agentes bactericidas como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos, con la capacidad de inhibir bacterias patógenas gram negativas y positivas (Blajman *et al.*, 2015; Prabhurajeshwar & Chandrakanth, 2017). Actualmente, se ha de conocer el modo de acción en el huésped para la selección de probióticos adecuados, por lo que se han de comprender las vías inmunes innatas que actúan en el intestino, identificar aquellas que optimizan la salud y el rendimiento intestinal y luego investigar qué cepas probióticas pueden inducir los efectos específicos necesarios (Tarradas *et al.*, 2020).

Una amplia variedad de bacterias (*Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, y *Lactococcus* spp.) y en algunos casos levaduras (*Saccharomyces* spp.) han sido testados como probióticos en producción avícola (FAO/WHO (2001) (Hotel & Cordoba, 2001) y se ha confirmado la capacidad antagonista de algunos probióticos contra varias cepas patógenas de *E. coli* (Fijan *et al.*, 2018). Las formulaciones de probióticos pueden contener una o más cepas de microorganismos y se pueden suministrar tanto de forma individual como en combinación con otros aditivos en pienso o en agua. Se utilizan diversas estrategias de aplicación, tales como nebulización sobre pollos o huevos fecundados o inoculación directa *in ovo*.

3.1- Fuente de probióticos, la glándula uropigial.

En la actualidad la selección de probióticos debería tener en cuenta la exploración de hábitats donde presuntamente haya poco contacto previo con antimicrobianos para reducir la probabilidad de obtener aislados portadores de resistencias a antibióticos (Tellez *et al.*, 2007). El aislamiento de posibles probióticos procedentes de la glándula uropigial de aves silvestres con escaso contacto con antibióticos entra dentro de esta estrategia innovadora.

La glándula uropigial es una glándula integumentaria de las aves, un órgano sebáceo bilobulado, variable en forma y tamaño según la especie, que se localiza dorsalmente entre la cuarta vértebra caudal y el pigostilo (Figura 2). Es una glándula holocrina presente en casi todas las especies de aves, que produce secreciones por las cuales quedan cubiertas las plumas durante el acicalamiento (J. Jacob & Ziswiler, 1982; S. Jacob *et al.*, 2014). La secreción de la glándula interviene en la higiene del plumaje controlando hongos y bacterias de la piel y ectoparásitos (Bandyopadhyay & Bhattacharyya, 1999; Shawkey *et al.*, 2007)

Las aves poseen una gran cantidad y variedad de patógenos en su plumaje, pero también poseen algunos microorganismos que pueden ser beneficiosos, involucrados en diversos procesos como la digestión, síntesis de nutrientes, protección contra la colonización de patógenos, o la producción de sustancias antimicrobianas, como bacteriocinas y metabolitos volátiles, que ayudan a proteger las plumas contra las bacterias queratinolíticas y no queratinolíticas y a los huevos de los patógenos. Estos microorganismos se encargan de mantener la estabilidad de la comunidad microbiana a través de la competencia y la cooperación, evitando así la colonización por agentes patógenos ambientales, por lo que se demuestra que actúa como un mecanismo de defensa antimicrobiano para regular los microorganismos en aves (S. Jacob *et al.*, 2014; Rodríguez-Ruano *et al.*, 2015).



Figura 2. Localización glándula uropigial en aves. (*Glándula uropigial*, 2019)

El aislamiento y la selección de cepas potencialmente probióticas de la glándula uropigial de aves silvestres, que aún no se han visto afectadas por los tratamientos antimicrobianos empleados en los animales domésticos, podría ser una alternativa para alcanzar un sustituto natural y eficaz a los antibióticos ya que supondría una reducción de emisiones de sustancias perjudiciales y contaminantes.

Objetivos

Objetivo principal:

- Exploración del potencial de la glándula uropigial como fuente de cepas probióticas, que constituyan un método alternativo al uso de antibióticos, para reducir la incidencia de colibacilosis y la mortalidad de los pollitos recién eclosionados.

Para ello se han de llevar a cabo los siguientes objetivos secundarios:

- Identificación de cepas aisladas de la glándula uropigial de aves silvestres.
- Estudio de la actividad antagonista frente a cepas patógenas de *E. coli*.

Material y métodos

1.- Cultivo de microorganismos

1.1- Cepas lácticas

En el presente estudio se dispuso de 47 cepas aisladas de la glándula uropigial de diversas aves silvestres (**Tabla 1**). Las cepas llegaron al laboratorio procedentes del centro de recuperación de aves rapaces GREFA, cultivadas en placas Petri de agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (BD-Difco), un medio selectivo en el que se estima que se obtiene un crecimiento adecuado de bacterias lácticas (Yang *et al.*, 2018).

Para la recuperación de las cepas en condiciones estériles, las cepas se sembraron en triple estría en una placa de MRS agar 1,5%, donde se incubaron en condiciones de microaerofilia a 37°C y durante 48h. Transcurrido este tiempo se seleccionó una colonia aislada, se inoculó en 6ml de medio MRS líquido y se incubó a 37°C durante 48h en condiciones de microaerofilia.

Las cepas se conservaron congeladas a -80°C. Para ello, se alicuotó en un criotubo parte del cultivo obtenido previamente homogenizado por agitación y se añadió glicerol estéril a una concentración final del 20% de glicerol.

Tabla 1. Procedencia de las cepas (ID) de la glándula uropigial.

ID	Especie animal	ID	Especie animal
209	Ánade real	233	Buitre negro
210	Abubilla	234	Buitre leonado
211	Abubilla	235	Búho chico
212	Abubilla	236	Águila de Bonelli
213	Águila de Bonelli	237	Garza real
214	Búho chico	238	Milano real
215	Garza real	239	Milano negro
216	Cernícalo vulgar	240	Gavilán
217	Búho real	241	Aguilucho lagunero
218	Cernícalo primilla	242	Águila de Bonelli
219	Cernícalo primilla	243	Cigüeña blanca
220	Águila de Bonelli	244	Cigüeña blanca
221	Cernícalo primilla	245	Cernícalo primilla
222	Cernícalo vulgar	246	Cernícalo primilla
223	Milano real	247	Buitre negro
224	Halcón peregrino	248	Azor
225	Milano negro	249	Águila de Bonelli
226	Cernícalo vulgar	250	Cernícalo vulgar
227	Cárabo	251	Azor
228	Cárabo	252	Ratonero
229	Milano real	253	Mochuelo
230	Milano real	254	Abubilla
231	Águila de Bonelli	255	Cernícalo vulgar
232	Águila de Bonelli		

1.2- *Escherichia coli*

La cepa de *E. coli* E027 empleada en la investigación es una cepa enteropatógena aislada de pollo. De modo rutinario, desde la cepa conservada en glicerol se obtuvieron colonias aisladas, se sembró mediante estría en placa de agar Luria-Bertani (LB, Condalab) y se cultivó durante 24 h a 37°C. A continuación, esas colonias aisladas se inocularon en medio LB líquido y se incubaron en agitación constante (200 rpm) a 37°C durante 24h.

2.- Identificación de las cepas aisladas

La identificación de los aislados se llevó a cabo mediante secuenciación del gen codificante del ácido ribonucleico ribosómico 16S (RNA 16S) mediante el método de Sanger, a partir de ADN genómico (ADNg) purificado.

Con este fin se cultivaron las colonias aisladas de las cepas en 4 mL de MRS, cultivadas de modo estático durante 48h a 37°C. Las bacterias se recogieron mediante centrifugación a 4000 × g, durante 10 minutos y a 4°C (HERMLE Z 383 K). Estas bacterias se utilizaron para la extracción de ADN genómico (ADNg).

Para la extracción de ADNg se empleó el kit de extracción NZY Microbial gDNA isolation kit (NZYtech) según las instrucciones del fabricante. La rotura previa de las bacterias se realizó con el homogeneizador (MP Biomedicals™ FastPrep-24™ 5G Instrument, marca MP Biomedicals™), seleccionando el protocolo establecido de extracción de ADNg que consta de 2 ciclos de 60s a 6m/s con una pausa de 30s. Para la elución del ADN se utilizó 50µL de agua ultrapura (ThermoScientific) previamente calentada a 70°C para mejorar el rendimiento del proceso. Finalmente, la concentración de ADN genómico se midió determinando la absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific).

Previamente a la secuenciación se amplificó el segmento de DNA correspondiente al gen codificante del RNA 16S. Para ello, se utilizó como molde el ADN genómico y se amplificó el gen 16S por reacción en cadena de polimerasa (PCR) en un termociclador (MRW). Se hizo uso de la polimerasa de NZYtech (NZYTaq II DNA Polymerase) y de los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

La mezcla de la reacción de PCR fue preparada en cabina según las condiciones recomendadas por el fabricante. En la composición de la mezcla de reacción (50 µl) las concentraciones finales de los componentes para la detección del gen 16S fue la siguiente: tampón de PCR (1X KAPA Taq Buffer), 0,4mM de trifosfatos de desoxinucleósidos (dNTP,Mix), 0,5µM de cada uno de los dos cebadores, 1U / µl de ADN polimerasa de NZYtech. se utilizó como molde 1 µl de ADNg extraído a una concentración entre 50-100ng/µl, finalmente se adicionó a la mezcla de reacción MgCl₂ a una concentración final de 2,5 mM.

La reacción de PCR se realizó siguiendo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C durante 4 min, 28 ciclos de 94°C durante 30s, 52°C durante 30s de hibridación, 72°C durante 1min y un paso de extensión final a 72°C durante 7 min.

La calidad e integridad de los fragmentos amplificados se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en tampón Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, ajustado a pH 8.3 (TBE). El tamaño de los fragmentos se estimó comparando su migración con un marcador de pesos moleculares de referencia GeneRuler 1 Kb plus DNA Ladder (Fisher), como cepa control se utilizó el genoma de la bacteria *Lactobacillus casei* BL23, cepa utilizada tradicionalmente en el laboratorio. Las condiciones de la electroforesis fueron, 100 V durante 20 minutos. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

Los fragmentos amplificados se purificaron mediante el kit NZY Gel Pure (NZYtech) y se cuantificaron midiendo la absorbancia a 260 nm como se ha indicado anteriormente. La secuenciación de las muestras se realizó externamente por la empresa "Eurofins Genomics". Las muestras enviadas contenían el DNA amplificado producto de PCR, a una concentración de entre 20-80 ng/μl y el cebador 27F a una concentración de 5 μM.

Finalmente, las secuencias fueron analizadas con el visor Chromas (Technelysium DNA sequencing Software program) y se determinó su similitud a secuencias depositadas en la base de datos GenBank mediante la herramienta Blastn implementada en National Center for Biotechnology (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1990), donde se tomó como secuencia identificadora de la cepa la que mayor score (parámetro de puntuación) obtuviese, junto con el máximo porcentaje de similitud, entre 86 y 100%.

3.- Efecto antagonista de las cepas aisladas

Se determinó el efecto y la capacidad de inhibición del sobrenadante de las cepas lácticas sobre el crecimiento de la cepa de *E. coli* E027.

3.1- Obtención de los sobrenadantes

El estudio de la inhibición del crecimiento de *E. coli* se llevó a cabo con el sobrenadante procedente del cultivo de las diferentes cepas en medio MRS y con este mismo sobrenadante neutralizado. Para ello, una colonia aislada se inoculó en medio MRS y se incubó 48h a 37°C. Tras la incubación, se separó el sobrenadante de las bacterias mediante centrifugación (4000 × g, 10 min, 4°C) y posterior filtrado (0.22 µM). El pH de los sobrenadantes se determinó utilizando un pHmetro (pH-metros BASIC 20+ de la marca Crison Instruments).

Para la neutralización de los sobrenadantes, se llevó a cabo una aproximación colorimétrica, utilizando el indicador de pH rojo de metilo (pH 4.2-6.3 rojo-amarillo). El indicador (0.04 % en etanol 96%) se adicionó a la muestra al 1%(v/v). Se corrigió la acidificación del medio adicionando el volumen necesario de NaOH 2M hasta el viraje al color del medio de cultivo MRS (pH 6.5).

3.1.1 Inhibición del crecimiento

El crecimiento de la cepa de *E. coli* E027 se llevó a cabo en placas de microtítulo de 96 pocillos (Deltalab, fondo plano). Se estudió el efecto del sobrenadante al 50%, tanto neutralizado como sin neutralizar. Para ello, una colonia aislada de la cepa de *E. coli* E027 se creció en medio BHI (Brain-Heart Infusion, Condalab) a 37°, y agitación (200 rpm) durante la noche (16h). Este cultivo se utilizó para inocular a una DO de 0.01 a 595 nm, 200 µl de medio de cultivo condicionado, es decir, compuesto por 100 µl del sobrenadante correspondiente y 100 µl de BHI 2X. El crecimiento de *E. coli* en condiciones de referencia se efectuó sustituyendo el sobrenadante por medio MRS.

El crecimiento de *E. coli* a 37°C se monitorizó en el espectrofotómetro PolarStar Omega (BMG LABTECH), registrando la absorbancia a 595 nm cada 30 min durante aproximadamente 20h. Los ensayos se realizaron por duplicado.

El efecto de la inhibición de los sobrenadantes sobre la cepa de *E. coli* se realizó comparando la tasa de crecimiento y la DO máxima alcanzada por la bacteria en presencia de estos con la condición de referencia. El ajuste de la ecuación de Gompertz [1] sobre la curva de crecimiento sigmoideal proporciona los datos de tasa de crecimiento y DO máxima entre otros valores. Se empleó el programa estadístico GraphPad prism 6.0 para dicho ajuste y para el análisis estadístico. Los datos obtenidos en presencia de los sobrenadantes se compararon con los datos obtenidos en condiciones de referencia mediante un análisis Anova de una vía, seguido del test de comparaciones múltiples Dunnett's.

$$[1] Y = N_0 + C * \exp \left(- \exp \left(\left(2.718 * \frac{mue}{C} \right) * (Lag - X) + 1 \right) \right)$$

- *N₀, número inicial de células*
- *C, diferencia entre el número de células inicial y final*
- *Lag, retraso antes del crecimiento, las mismas unidades que X*
- *mue, tasa de crecimiento específico máximo.*
- *X es el tiempo (h), Y Abs*

3.1.2 Criterio de selección de cepas

Aquellas cepas cuyo sobrenadante neutralizado disminuya la tasa de crecimiento o la DO max de la cepa de *E. coli* E027 en al menos un 15% de manera significativa se seleccionarán para posteriores análisis.

Resultados

1.- Identificación de las cepas

Se pudo extraer ADN_g de todos los aislados excepto de 224, 235, 236, 245 y 252, ya que no se consiguió cultivarlas tras repetidos intentos en las condiciones de laboratorio. Las concentraciones de ADN_g de las muestras obtenidas variaron entre 0,56 y 501 ng/μl.

La secuenciación directa de un gen a partir de ADN_g por el método de Sanger requeriría una gran cantidad de ADN, lo que lo hace técnicamente difícil y muy poco eficaz. Por ello, se amplificó mediante PCR el gen codificante del ARN 16S y, de este modo, se obtuvo suficiente cantidad de ADN_g para secuenciarlo. Para verificar el correcto funcionamiento de la reacción de amplificación se analizaron los productos de las reacciones mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8%. Como se muestra en la **Figura 3**, en todos los casos se puede identificar el fragmento esperado de 1465pb del gen 16S, ya que se encuentra a la altura adecuada del marcador de peso molecular. La única excepción fue la cepa 245, de la que no se pudo obtener DNA amplificado y fue descartada de los ensayos posteriores. No se observó amplificación o sólo se apreció una banda residual en los controles negativos indicando que no hubo contaminación en los componentes de la PCR que pudiera comprometer los resultados de la secuenciación. Asimismo, la obtención de la banda de tamaño esperado en la amplificación de los controles positivos confirmó la especificidad de la reacción de PCR. Se consideró por tanto que las reacciones de amplificación habían funcionado correctamente y se procedió a la secuenciación de los fragmentos purificados.

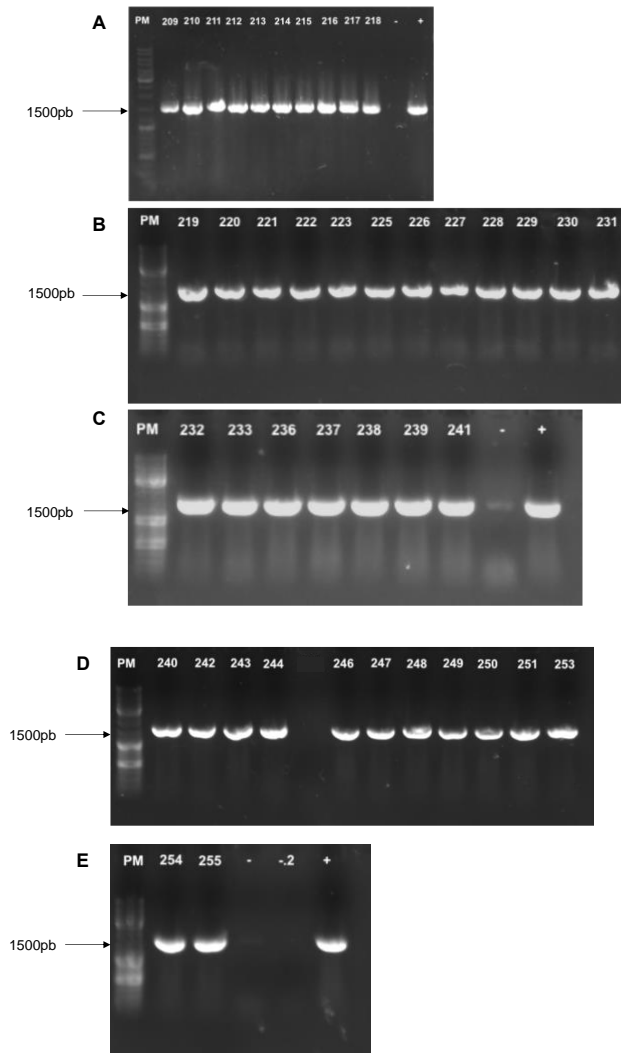


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 0,8%. Obtención del gen 16S, fragmento de 1465 pb por amplificación PCR de las cepas lácticas. (-) Control negativo, (+) Control positivo, (PM) Marcador de peso molecular. (A) Cepas de la 209-218 (B) Cepas de la 219-231 (C) Cepas de la 232-241 (D) Cepas de la 240-255 (E) Cepas 254 y 255.

Una vez obtenidas las secuencias, se examinaron mediante el visor Chromas para determinar su calidad y eliminar los extremos de las secuencias que suelen tener baja calidad. Las secuencias editadas se analizaron seguidamente con la herramienta Blastn, para identificar las secuencias de nucleótidos depositadas en la base de datos GenBank con mayor similitud. Para ello, los parámetros que se tuvieron en cuenta fueron: el score, el cual a mayor score mayor alineación o similitud de la secuencia problema con la de referencia, y también se determinó según el porcentaje de similitud, que estuvo entre un 86 y 100%. El resultado que mayor puntuación obtuvo en esos

parámetros fue el seleccionado, indicándose la longitud de secuencia identificada (**Tabla 2**). No obstante, debe tenerse en cuenta que la similitud de secuencia de RNA 16S no es un criterio inequívoco para la identificación a nivel de especie y que serían necesarios análisis adicionales. Por tanto, aunque la asignación de género es fiable, la asignación de especie debe considerarse provisional.

Tabla 2. Identificación cepas de la glándula uropigial. Parámetros; score, porcentaje de identidad y longitud de secuencia identificada.

ID	Identificación	Score	Porcentaje Identidad	Longitud secuencia identificada (pb)
209	<i>Rothia mucilaginosa</i>	737	99.51%	1048
210	<i>Morganella morgani</i>	1599	96.85%	1011
211	<i>Enterococcus faecalis</i>	1232	99.56%	677
212	<i>Enterococcus faecalis</i>	1190	99.10%	665
213	<i>Enterococcus faecium</i>	1947	96.93%	1346
214	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1853	95.63%	1397
215	<i>Enterococcus faecium</i>	1203	99.85%	655
216	<i>Enterococcus gallinarum</i>	1099	96.96%	1363
217	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1026	99.64%	562
218	<i>Staphylococcus lentus</i>	1478	99.51%	818
219	<i>Staphylococcus succinus</i>	1961	98.94%	1131
220	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	1964	99.20%	1121
221	<i>Enterococcus faecium</i>	1229	99.85%	668
222	<i>Enterococcus faecalis</i>	1206	99.85%	657
223	<i>Enterococcus hirae</i>	10676	100.00%	966
225	<i>Enterococcus faecalis</i>	1341	99.73%	732
226	<i>Staphylococcus succinus</i>	1057	100.00%	572
227	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1506	99.88%	818
228	<i>Enterococcus faecalis</i>	1144	98.17%	656
229	<i>Enterococcus faecium</i>	1214	99.85%	661
230	<i>Enterococcus faecium</i>	1648	99.67%	901
231	<i>Enterococcus faecium</i>	1483	100.00%	803
232	<i>Enterococcus faecalis</i>	1197	99.85%	653
233	<i>Enterococcus lactis</i>	1792	99.69%	979
234	<i>Enterococcus faecium</i>	1072	100.00%	649
237	<i>Enterococcus saigonensis</i>	1574	99.54%	866
238	<i>Enterococcus faecium</i>	1118	98.13%	642

239	<i>Enterococcus faecalis</i>	1700	99.68%	929
240	<i>Staphylococcus arlettae</i>	1454	99.87%	796
241	<i>Enterococcus faecium</i>	2006	99.19%	1114
242	<i>Enterococcus faecalis</i>	1912	99.71%	1053
243	<i>Staphylococcus arlettae</i>	1116	98.73%	630
244	<i>Enterococcus faecium</i>	11518	99.90%	1050
246	<i>Enterococcus sp.</i>	992	86.33%	971
247	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1628	99.01%	919
248	<i>Enterococcus faecalis</i>	2050	99.82%	1120
249	<i>Enterococcus faecalis</i>	1991	98.84%	1118
250	<i>Enterococcus faecalis</i>	2139	99.74%	1172
251	<i>Enterococcus faecalis</i>	1938	98.99%	1084
253	<i>Enterococcus faecalis</i>	2026	99.29%	1125
254	<i>Enterococcus faecalis</i>	1949	99.26%	1080
255	<i>Enterococcus faecalis</i>	1376	98.83%	782

El análisis de las cepas por género (**Figura 4**) aisladas de la glándula uropigial muestra que la mayoría (72%) pertenecen al género *Enterococcus*, seguido del género *Staphylococcus* (24%) y, minoritariamente por los géneros *Rothia* (2%) y *Morganella* (2%).

Identificación de cepas de la glándula uropigial

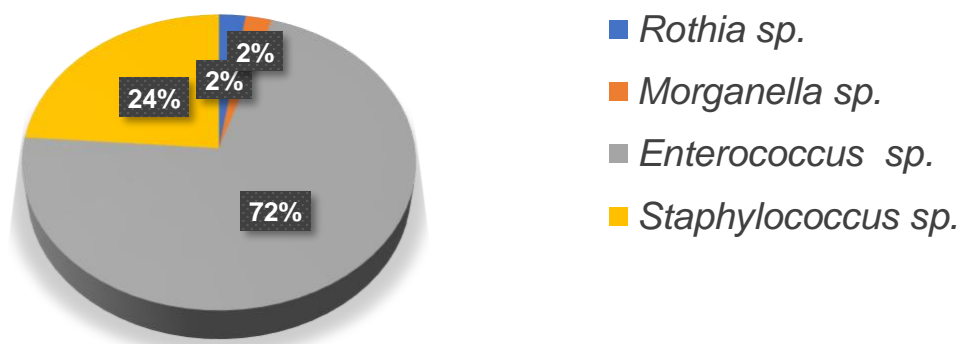


Figura 4. Género de las bacterias de la glándula uropigial.

2.- Inhibición de la cepa patógena

2.1- Crecimiento cultivos

2.1.1- Crecimiento cepas glándula uropigial.

En el presente estudio se caracterizaron 47 (ID 209-255) cepas provenientes de la glándula uropigial. En primer lugar, se determinó su capacidad de crecimiento en MRS (**Figura 5**). Para ello, fueron inoculadas en placas de medio MRS agar, incubadas durante 48h y sucesivamente cultivadas en medio MRS líquido durante otras 48h. El crecimiento de las cepas fue determinado mediante la densidad óptica (DO) a 595nm, en este sentido las cepas con mayor crecimiento fueron ID 223 y 234 (DO>3). Por el contrario, las cepas ID 224, 235, 236, 245 y 252 no llegaron a crecer en las placas de cultivo, por este motivo se descartaron del estudio.

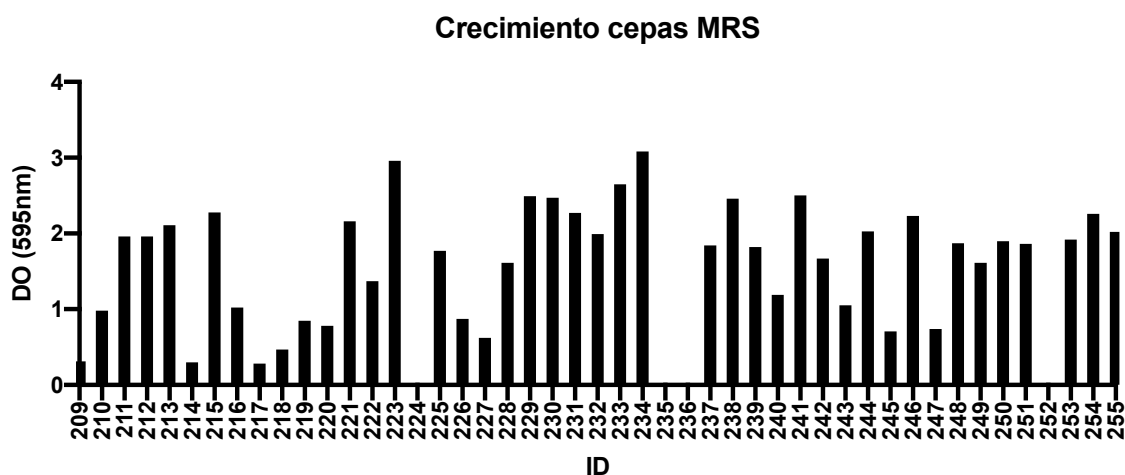


Figura 5. Crecimiento de las cepas (ID: 209-255) en MRS líquido. Densidad óptica de los cultivos a 595nm tras 48h a 37°C.

2.1.2- Crecimiento *E. coli*

Los valores de los parámetros de crecimiento de referencia de la cepa de *E. coli* E027 que se emplearon para los ensayos de inhibición por sobrenadante fueron los indicados en la **Tabla 3**. Como se muestra en la **Figura 6**, el crecimiento de *E. coli* se ajusta a una curva sigmoidea, indicando que la cepa pudo crecer exponencialmente en las condiciones de cultivo de referencia utilizadas.

Tabla 3. Condiciones de referencia de la cepa E027 de *E. coli*. Tasa de crecimiento (mue) y densidad óptica máxima (C) alcanzada.

	E027
C	2,146
Mue (h⁻¹)	0,8744

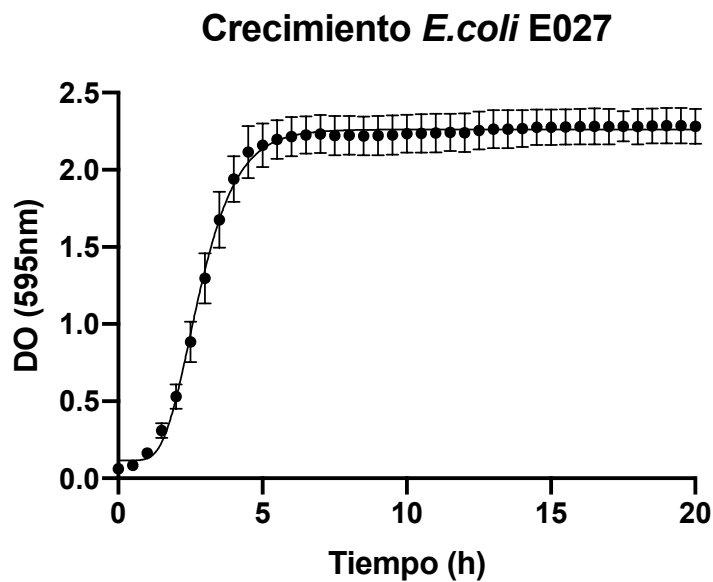


Figura 6. Curva de crecimiento de la cepa E027 de *E. coli*.

2.2- Sobrenadante sin neutralizar

La finalidad de este estudio fue analizar el comportamiento de la cepa E027 de *E. coli* frente a los sobrenadantes de las diferentes cepas. Se determinó el pH de cada sobrenadante ya que la acidez es un factor importante de inhibición del crecimiento de *E. coli*. Para este ensayo, los sobrenadantes se filtraron, dejando que la solución estuviese libre de bacterias que no interfirieran en el resultado final al medir las densidades ópticas.

Como se puede observar en la **Figura 7**, la tasa de crecimiento (mue) de *E. coli* se ve afectada frente al pH. Concretamente, el crecimiento de *E. coli* se ve parcial o

totalmente inhibido a mayor acidez, a excepción de algunos casos donde se puede observar una tasa de crecimiento de entre 0,5-1 a pH ácido (pH<6), de la misma manera, la tasa de crecimiento de *E. coli* es mayor a medida que el pH aumenta.

Se muestra una correlación positiva, en la que a mayor pH mayor crecimiento de la cepa de *E. coli*.

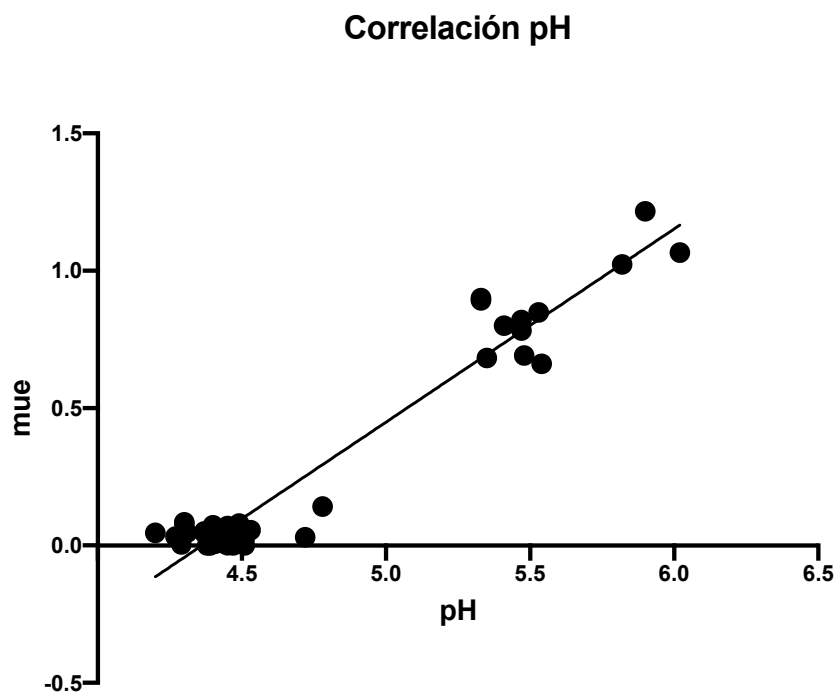


Figura 7. Correlación pH. Tasa de crecimiento de *E. coli* en correlación con el pH del sobrenadante al 50%.

Como se muestra en la **Tabla 4**, los sobrenadantes (ID) más ácidos resultaron en una reducción de la DO máxima alcanzada. Todos ellos correspondieron a cepas de *Enterococcus*. Los sobrenadantes de los demás aislados o redujeron escasamente la DO máxima alcanzada o incluso la aumentaron, en algunos casos, como la cepa 217, de modo notable. Los sobrenadantes que más inhibieron el crecimiento fueron los de las cepas (ID) 213 y 232, ambos inhibiendo un 100% con un pH de 4,47 y 4,51 respectivamente.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento de *E. coli* con respecto al valor de referencia, según pH del sobrenadante de la cepa (ID). Los valores negativos indican incrementos sobre el valor de referencia.

ID	Identificación	% inhibición	pH
209	<i>Rothia mucilaginosa</i>	-21,96935041	6,02
210	<i>Morganella morganii</i>	21,91216834	5,35
211	<i>Enterococcus faecalis</i>	99,97712717	4,38
212	<i>Enterococcus faecalis</i>	99,99428751	4,39
213	<i>Enterococcus faecium</i>	100	4,47
214	<i>Staphylococcus sciuri</i>	-17,01738335	5,82
215	<i>Enterococcus faecium</i>	99,90890897	4,45
216	<i>Enterococcus gallinarum</i>	96,60584401	4,72
217	<i>Staphylococcus sciuri</i>	-39,12397072	5,9
218	<i>Staphylococcus lentus</i>	6,187099726	5,47
219	<i>Staphylococcus succinus</i>	20,90576395	5,48
220	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	10,57868253	5,47
221	<i>Enterococcus faecium</i>	99,33325709	4,4
222	<i>Enterococcus faecalis</i>	96,80409424	4,5
223	<i>Enterococcus hirae</i>	97,01852699	4,51
225	<i>Enterococcus faecalis</i>	97,4103957	4,45
226	<i>Staphylococcus succinus</i>	8,531564501	5,41
227	<i>Staphylococcus sciuri</i>	24,34240622	5,54
228	<i>Enterococcus faecalis</i>	95,6884721	4,51
229	<i>Enterococcus faecium</i>	95,98639067	4,45
230	<i>Enterococcus faecium</i>	99,30809698	4,44
231	<i>Enterococcus faecium</i>	99,16685727	4,41
232	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	4,51
233	<i>Enterococcus lactis</i>	90,7633806	4,3
234	<i>Enterococcus faecium</i>	94,1702882	4,37
237	<i>Enterococcus saigonensis</i>	96,3134721	4,27
238	<i>Enterococcus faecium</i>	94,66605672	4,31
239	<i>Enterococcus faecalis</i>	94,06164227	4,47
240	<i>Staphylococcus arlettae</i>	-2,024245197	5,33
241	<i>Enterococcus faecium</i>	99,540828	4,29
242	<i>Enterococcus faecalis</i>	90,86688015	4,49
243	<i>Staphylococcus arlettae</i>	-2,962031107	5,33
244	<i>Enterococcus faecium</i>	83,77744739	4,78
246	<i>Enterococcus sp.</i>	94,88906679	4,37
247	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2,9563129	5,53
248	<i>Enterococcus faecalis</i>	91,83954712	4,45
249	<i>Enterococcus faecalis</i>	93,65736505	4,53
250	<i>Enterococcus faecalis</i>	98,32742452	4,41

251	<i>Enterococcus faecalis</i>	91,57193504	4,4
253	<i>Enterococcus faecalis</i>	93,28110704	4,4
254	<i>Enterococcus faecalis</i>	94,71866423	4,2
255	<i>Enterococcus faecalis</i>	90,34709515	4,3

2.3- Sobrenadante neutralizado

Con la finalidad de averiguar si había otros componentes en el sobrenadante, tales como metabolitos secundarios, resultantes de la actividad de las bacterias que pudieran causar algún efecto inhibitorio en *E. coli*, se neutralizaron los sobrenadantes. En la **figura 8** se muestra un histograma de la densidad óptica máxima (DO_{max}) (C) alcanzada por *E. coli* cultivada junto con los sobrenadantes neutros de las cepas. De acuerdo con anteriores ensayos llevados a cabo en el laboratorio, se estableció arbitrariamente como criterio selectivo un valor mínimo de inhibición del 15%.

Los sobrenadantes que inhibieron significativamente el crecimiento en un 15% o más fueron los de las cepas 211, 223, 229, 230, 231, 237, 246 y 253, todas ellas pertenecientes al género *Enterococcus*. Concretamente, los sobrenadantes neutralizados inhibieron en un porcentaje de: 211: 23,3 %, 223: 24,1%, 229: 23,7%, 230: 23,9%, 231: 23,9%, 237: 28,8%, 246: 23,8% y 253: 31,1% de ellos los más significativos fueron 237 y 253, ambos con un p-valor de 0,01 (**Tabla 5**).

Por el contrario, no se observó en ningún caso reducción de la tasa de crecimiento (mue) de *E. coli* por debajo del 15% (**Figura 9**). Al contrario, en la mayoría de los casos la tasa de crecimiento fue superior a la observada en condiciones de referencia (**Tabla 5**).

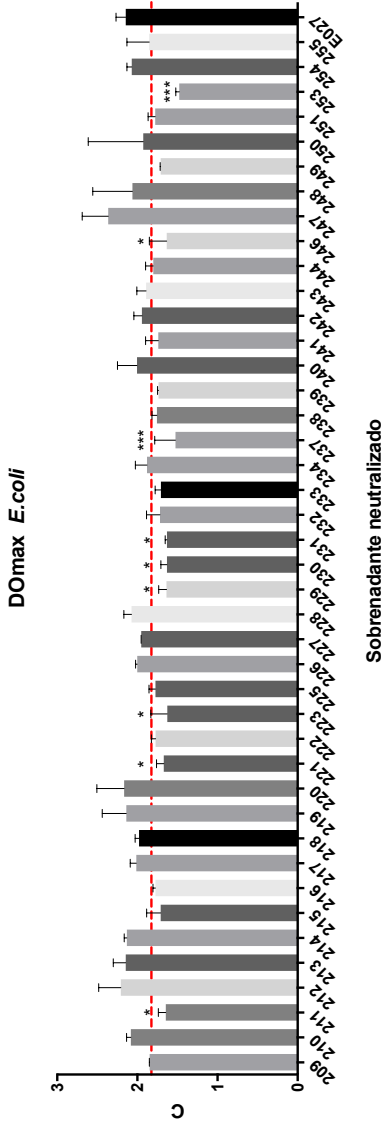


Figura 8. Densidad óptica máxima (DOmax) (C) alcanzada por *E.coli* cultivada en los sobrenadantes al 50%, con pH neutro. Los valores corresponden a la media \pm error estándar de la cepa E027 de *E.coli*, las diferencias significativas están indicadas como (* $(P<0,05)$), ** $(P<0,01)$ y *** $(P<0,001)$). Línea roja representa la DOmax de *E. coli* inhibida al 15%.

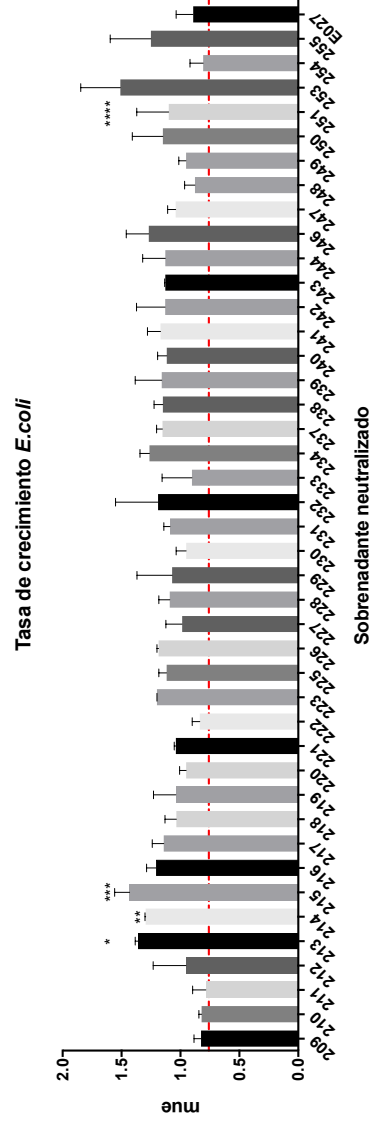


Figura 9. Tasa de crecimiento (mue) de *E.coli* cultivada en los sobrenadantes al 50%, con pH neutro. Los valores corresponden a la media \pm error estándar de la cepa E027 de *E.coli*, las diferencias significativas están indicadas como (* $(P<0,05)$), ** $(P<0,01)$), *** $(P<0,001)$ y **** $(P<0,0001)$). Línea roja representa la tasa de crecimiento (mue) de *E.coli* inhibida al 15%.

Tabla 5. Inhibición de *E. coli* por los sobrenadantes neutralizados de las cepas (ID). Valores de densidad óptica máxima (C) y tasa de crecimiento (mue), significatividad (p-valor) indicado como (* $(P<0,05)$ ** $(P<0,01)$ *** $(P<0,001)$ y **** $(P<0,0001)$)).

ID	C	Inhibición (%)	p-valor	mue	Inhibición (%)	p-valor
209	1,85	15,1	ns	0,8259	4,6525052	ns
210	2,083	4,41	ns	0,8218	5,12583699	ns
211	1,646	24,46	*	0,7857	9,29346571	ns
212	2,209	-1,38	ns	0,9531	-10,032325	ns
213	2,147	1,47	ns	1,362	-57,238513	**
214	2,134	2,07	ns	1,296	-49,619026	*
215	1,711	21,48	ns	1,433	-65,435234	***
216	1,776	18,49	ns	1,208	-39,459709	ns
217	2,016	7,48	ns	1,143	-31,955668	ns
218	1,981	9,09	ns	1,035	-19,487416	ns
219	2,14	1,79	ns	1,041	-20,180097	ns
220	2,168	0,5	ns	0,9521	-9,9168783	ns
221	1,671	23,31	*	1,04	-20,06465	ns
222	1,773	18,63	ns	0,8377	3,2902332	ns
223	1,629	25,24	*	1,2	-38,536135	ns
225	1,775	18,54	ns	1,12	-29,300393	ns
226	2,003	8,08	ns	1,187	-37,035327	ns
227	1,953	10,37	ns	0,9872	-13,96906	ns
228	2,073	4,86	ns	1,093	-26,183329	ns
229	1,638	24,83	*	1,072	-23,758947	ns
230	1,634	25,01	*	0,9522	-9,928423	ns
231	1,634	25,01	*	1,09	-25,836989	ns
232	1,72	21,06	ns	1,192	-37,612561	ns
233	1,707	21,66	ns	0,9043	-4,3985223	ns
234	1,881	13,68	ns	1,265	-46,040175	ns
237	1,527	29,92	***	1,154	-33,225583	ns
238	1,757	19,37	ns	1,152	-32,994689	ns
239	1,737	20,28	ns	1,16	-33,918264	ns
240	2,006	7,94	ns	1,118	-29,069499	ns
241	1,739	20,19	ns	1,17	-35,072731	ns
242	1,944	10,78	ns	1,131	-30,570307	ns
243	1,891	13,22	ns	1,13	-30,45486	ns
244	1,803	17,26	ns	1,13	-30,45486	ns
246	1,635	24,97	*	1,271	-46,732856	ns
247	2,366	-8,58	ns	1,042	-20,295544	ns
248	2,062	5,37	ns	0,8776	-1,3160933	ns
249	1,707	21,66	ns	0,9541	-10,147772	ns
250	1,929	11,47	ns	1,151	-32,879243	ns

251	1,78	18,31	ns	1,1	-26,991457	****
253	1,478	32,17	***	1,512	-74,55553	ns
254	2,071	4,96	ns	0,8083	6,68436851	ns
255	1,853	14,96	ns	1,252	-44,539367	ns

Discusión

En la investigación se obtuvo la identidad de las cepas mediante el gen 16S ARNr, un marcador molecular para la identificación de especies bacterianas que, por su universalidad y conservación de la secuencia, resulta óptimo para este propósito. Hay estudios que establecen un nivel de concordancia a nivel de género del 96% y una tasa de concordancia a nivel de especie del 87,5% entre los métodos clásicos de identificación y la identificación por secuenciación del gen codificante del ARNr 16S, siendo esta última la metodología más fiable (Srinivasan *et al.*, 2015). No obstante, como se ha señalado antes, en muchos casos no es suficiente para establecer una identificación inequívoca a nivel de especie.

La microbiota de la glándula uropigial de muchas de las aves de las que proceden las cepas utilizadas en este estudio no ha sido caracterizada. En aquellos casos en los que se dispone de datos, como la abubilla (Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2014), las especies pertenecientes al género *Enterococcus* son las más habituales como hemos encontrado en este estudio. Concretamente las especies más frecuentes detectadas fueron *Enterococcus faecalis* seguida de *Enterococcus faecium*, algo habitual en las bacterias simbiotas de la glándula uropigial de la abubilla (Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2013, 2014). No obstante, hay que tener en cuenta que los aislamientos se efectuaron en medio MRS, un medio optimizado para el crecimiento de bacterias lácticas, por lo que se introdujo un gran sesgo en el tipo de cepas aisladas. El siguiente género más común fue *Staphylococcus* (24%). Este género también se ha encontrado en estudios sobre la glándula uropigial de la abubilla (Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2013, 2014), con una menor incidencia de aparición. El estudio de la microbiota de la glándula uropigial de la abubilla ha mostrado que esta varía a lo largo de la vida del ave, teniendo en cuenta su ciclo reproductivo, edad y capacidad para adquirir bacterias horizontalmente del medio ambiente (Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2014). Asimismo, se ha observado que las especies bacterianas presentes en el material de los nidos pueden colonizar la glándula uropigial de la abubilla (Díaz-Lora *et al.*, 2019). En cambio en el paño boreal (*Oceanodroma leucorhoa*) se ha descrito una microbiota muy diferente, dominada por bacterias gram negativas (Pearce *et al.*, 2017). En el junco pizarroso (*Junco hyemalis*) las especies más frecuentemente detectadas son también gram negativas (60.5%), con Firmicutes (24.3%) y Actinobacteria (14.3%) como los otros dos grupos más abundantes (Whittaker *et al.*, 2019). Aunque el número de especies de aves estudiadas es muy reducido, los datos disponibles sugieren que puede haber una

considerable variabilidad en la composición de la microbiota asociada a la glándula uropigial.

Se identificaron además dos cepas pertenecientes a los géneros *Rothia* y *Morganella*. *Rothia mucilaginoso* es una bacteria que forma parte de la flora orofaríngea normal y es responsable de patologías infecciosas en humanos. Se ha descrito la detección de *Rothia* como un componente minoritario de la microbiota de la glándula uropigial del junco pizarroso (Whittaker *et al.*, 2019). Por su parte, *Morganella morganii* es una bacteria que se encuentra normalmente en el medio ambiente y en los tractos intestinales de humanos, mamíferos y reptiles como parte de la flora normal, posee factores de virulencia que la plantean como un patógeno oportunista que causa principalmente infecciones de heridas y del tracto urinario (Liu *et al.*, 2016), otro estudio establece la aparición de infecciones en pollitos donde *M. morganii* muestra una patogenicidad severa (Zhao *et al.*, 2012). No se ha descrito la presencia de especies de *Morganella* en la glándula uropigial de aves, pero dado el limitado conocimiento disponible sobre las comunidades microbianas asociadas a este órgano, no podría atribuirse su aislamiento a una contaminación de la muestra sin más evidencias.

Puesto que los aislamientos se efectuaron originalmente mediante cultivo en medio MRS, ya que se pretendía favorecer el crecimiento de bacterias lácticas, se siguió utilizando este medio por proveer las condiciones adecuadas para el desarrollo de las bacterias lácticas (Yang *et al.*, 2018). La razón de este planteamiento es que el objeto del estudio era el aislamiento de cepas con potencial para ser utilizadas como probióticos para pollos y, como se ha señalado anteriormente, las bacterias lácticas, por sus propiedades e inocuidad, eran el grupo bacteriano más prometedor. De este modo, las cepas que se sembraron y no crecieron (ID 224, 235, 236, 245 y 252) podrían no haber crecido porque no fueran bacterias lácticas y el MRS no fuera un medio óptimo para su crecimiento de manera que hubieran perdido su viabilidad durante la conservación.

En cuanto al estudio de la inhibición del crecimiento de la bacteria *E. coli* por los sobrenadantes de las cepas, se determinó el efecto del pH sobre esta, donde se mostró que el crecimiento de la cepa E027 de *E. coli* establece una correlación positiva con el pH del medio donde se cultiva (Figura 7). Las cepas que más inhibieron pertenecen al género *Enterococcus*, que son las que alcanzan los pH más bajos. Esto es de esperar porque son organismos de metabolismo fermentativo obligado mientras que los otros son facultativos, es decir, pueden también degradar oxidativamente la glucosa. La

actividad antibacteriana del ácido láctico ha sido comprobada en un gran número de estudios (véase por ejemplo (Chotigarpa *et al.*, 2019)). Asimismo, se dispone de evidencia de la eficacia del uso de probióticos constituidos por bacterias lácticas para disminuir la carga de bacterias gram negativas en pollos (Asl *et al.*, 2018).

Por otro lado, se determinó si en los sobrenadantes de las cepas se encontraban metabolitos secundarios producidos por estas que inhibieran el crecimiento de *E. coli*. Para ello, se determinó la tasa de crecimiento junto con la densidad óptica máxima alcanzada de *E. coli* en cultivo con los sobrenadantes neutralizados y filtrados, comparándolo con las condiciones de referencia de *E. coli*.

En los resultados de esta investigación no se obtuvo que ningún sobrenadante de las cepas ejerciera algún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la cepa E027 de *E. coli* (Tabla 5), sí hubieron sobrenadantes de cepas que reducían la densidad óptica máxima alcanzada de *E. coli*, cepas ID: 211, 223, 229, 230, 231, 237, 246 y 253 todas ellas pertenecientes al género *Enterococcus* (Tabla 2), esto se puede deber a que estos producen una mayor concentración de sustancias antimicrobianas, o bien que las sustancias que producen tienen un espectro más amplio de actividad, pero por el contrario no inhibieron suficiente la tasa de crecimiento de *E. coli*.

En cuanto al resto de cepas, no se obtuvieron resultados que mostrasen un efecto antagonista sobre *E. coli*. En la investigación de Fijan *et al.* (Fijan *et al.*, 2018), se obtuvieron unos resultados donde todos los probióticos empleados mostraron efectos antagonistas contra los patotipos de *E. coli*, y los resultados de los ensayos de cocultivo mostraron que los probióticos de una sola cepa fueron mucho más efectivos que los probióticos de múltiples cepas. Esta investigación establece que las especies probióticas más eficientes contra todas las cepas de *E. coli* pertenecían a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, y *Enterococcus*, concluyendo que hay que tener precaución al elegir la cepa probiótica, ya que no todas muestran la misma efectividad. Esta jerarquía de bacterias lácticas en cuanto a la inhibición de *E. coli* se encuentra en concordancia con otros estudios como el de Chapman *et al.* (Chapman *et al.*, 2012). Además, este estudio establece la una correlación positiva entre la concentración de metabolitos y la capacidad de inhibición del patógeno.

Finalmente, en el presente estudio podemos afirmar que no se obtuvieron cepas lácticas con capacidad inhibitoria sobre *E. coli* más allá del efecto asociado a la producción de ácido láctico. En general las cepas de los géneros *Lactobacillus* y

Bifidobacterium tienen mayor capacidad de inhibición que las cepas de *Enterococcus*, que han sido las analizadas en nuestra investigación. No obstante, existen muchas otras variables que influyen en el resultado de los estudios con probióticos. Por ejemplo, el porcentaje de sobrenadante, actualmente se realiza a un 50%, la concentración de metabolitos secundarios y el tiempo de administración son relevantes para el resultado favorable de un tratamiento (Dubreuil, 2017).

Por lo tanto, este estudio es solo el primer paso para predecir el efecto de los probióticos en la cepa E027 de la bacteria *E. coli* causante de APEC y se necesitan más estudios en forma de ensayos para determinar la eficacia real de los probióticos.

Por lo tanto, este estudio debe considerarse solo como el primer paso para analizar el potencial de la glándula uropigial como fuente de probióticos eficaces contra *E. coli* APEC y se necesitan más estudios para determinar el potencial de estas cepas. No obstante, los resultados obtenidos indican que la glándula uropigial posiblemente no sea la mejor opción a la hora de seleccionar una fuente para el aislamiento de cepas con potencial probiótico.

Conclusión

Las conclusiones del presente trabajo son:

1. Los aislados de cepas de bacterias lácticas obtenidos de la glándula uropigial pertenecieron en su mayoría al género *Enterococcus*.
2. Se ha constatado que el pH ácido, consecuencia de la actividad fermentativa de las cepas inhibe el crecimiento de las cepas patógenas de *E. coli*.
3. No se han determinado que las cepas analizadas produzcan metabolitos secundarios con capacidades antagonistas frente a *E. coli*.

Finalmente se ha evaluado que la glándula uropigial no posee un gran potencial como fuente de cepas probióticas con capacidad de reducir la incidencia de colibacilosis y la mortalidad de los pollitos recién eclosionados.

Líneas futuras

Con la finalidad de llevar a cabo un estudio sobre el papel de los probióticos inhibiendo el crecimiento de *E. coli*, se podrían plantear diferentes experimentos.

Uno de ellos sería la determinación de otras fuentes alternativas para el aislamiento de probióticos como, por ejemplo; heces y cloaca, donde posiblemente se podrían encontrar una mayor diversidad de bacterias.

Por otro lado, hay muchas características de los probióticos de las que se puede hacer uso para su aplicación. Una de las líneas futuras sería desarrollar un probiótico compuesto de distintas variedades de cepas, por lo que se podría llevar a cabo una combinación de características como; capacidad de auto agregación y coagregación que podrían suponer un avance en cuanto a la capacidad de adhesión de las cepas lácticas a la cáscara de huevo, también cepas que muestren una inhibición del crecimiento de *E. coli* mayor al 15% por sobrenadante, ya sea por acidez o por producción de metabolitos secundarios tales como bacteriocinas, y finalmente, propiedades como formación de biofilm y de H₂O₂ también son importantes.

En general hay diversidad de características que pueden poseer en cocultivo con otras cepas que serían beneficiosas para conseguir el objetivo de esta investigación.

Bibliografía

- Abid, M. B., & Koh, C. J. (2019). Probiotics in health and disease: fooling Mother Nature? *Infection*, 47(6), 911-917. <https://doi.org/10.1007/s15010-019-01351-0>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Asl, R. S., Shariatmadari, F., Sharafi, M., Torshizi, M. A. K., & Shahverdi, A. (2018). Historic perspective : Prebiotics , probiotics , and other alternatives to Antibiotics. *Poultry Science, In Press*(11), 4020. <https://doi.org/10.3382/ps>
- Awad, A. M., El-shall, N. A., Khalil, D. S., El-hack, M. E. A., Swelum, A. A., Mahmoud, A. H., Ebaid, H., Komany, A., Sasmour, R. H., & Sedeik, M. E. (2020). Incidence, pathotyping, and antibiotic susceptibility of avian pathogenic *escherichia coli* among diseased broiler chicks. *Pathogens*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens9020114>
- Aznar, R., & Zúñiga, M. (2000). ¿Que son las bacterias Lácticas? *Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC)*., 1-8.
- Bandyopadhyay, A., & Bhattacharyya, S. (1999). *Influence of fowl uropygial gland and its secretory lipid components on the growth of skin surface fungi of fowl.*
- Blajman, J., Gaziano, C., Zbrun, M. V., Soto, L., Astesana, D., Berisvil, A., Scharpen, A. R., Signorini, M., & Frizzo, L. (2015). In vitro and in vivo screening of native lactic acid bacteria toward their selection as a probiotic in broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, 101, 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.05.017>
- Chapman, C. M. C., Gibson, G. R., & Rowland, I. (2012). In vitro evaluation of single- and multi-strain probiotics: Inter-species inhibition between probiotic strains, and inhibition of pathogens. *Anaerobe*, 18(4), 405-413. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.05.004>
- Chotigarpa, R., Lampang, K. N., Pikulkaew, S., Okonogi, S., Silman, P., & Mektrirat, R. (2019). Antiseptic effect of natural teat dip containing lactic acid against mastitis-

causing *Escherichia coli*. *Veterinary World*, 12(3), 397-401.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.397-401>

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. En *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 26, Número 4, pp. 822-880). American Society for Microbiology (ASM). <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>

Díaz-Lora, S., Martín-Vivaldi, M., Juárez García-Pelayo, N., Azcárate García, M., Rodríguez-Ruano, S. M., Martínez-Bueno, M., & Soler, J. J. (2019). Experimental old nest material predicts hoopoe *Upupa epops* eggshell and uropygial gland microbiota. *Journal of Avian Biology*, 50(9), jav.02083.
<https://doi.org/10.1111/jav.02083>

Dibner, J., & Richards, J. (2005). Promotores de crecimiento antibiótico en agricultura : historia y modo de acción. *Ciencia avícola*.

Dubreuil, J. D. (2017). Enterotoxigenic *Escherichia coli* and probiotics in swine: What the bleep do we know? En *Bioscience of Microbiota, Food and Health* (Vol. 36, Número 3, pp. 75-90). BMFH Press. <https://doi.org/10.12938/bmfh.16-030>

Ewers, C., Janßen, T., Kießling, S., Philipp, H.-C., & Wieler, L. H. (2005). Rapid Detection of Virulence-Associated Genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Avian Diseases*, 49(2), 269-273.
<https://doi.org/10.1637/7293-102604r>

Fijan, S., Šulc, D., & Steyer, A. (2018). Study of the in vitro antagonistic activity of various single-strain and multi-strain probiotics against *Escherichia coli*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(7).
<https://doi.org/10.3390/ijerph15071539>

Glándula uropigial. (2019). Glándula uropigial. <https://hablemosdeaves.com/glandula-uropigial/>

Guabiraba, R., & Schouler, C. (2015). Avian colibacillosis: still many black holes. *FEMS Microbiology Letters*, 362(15). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv118>

- Hotel, A., & Cordoba, A. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention*, 5(1), 1-34.
- Jacob, J., & Ziswiler, V. (1982). *La glándula uropigial*. Farner DS, King JR, Parkes KC, eds. *Biología aviar vol . 6 : 199–324*.
- Jacob, S., Immer, A., Leclaire, S., Parthuisot, N., Ducamp, C., Espinasse, G., & Heeb, P. (2014). Uropygial gland size and composition varies according to experimentally modified microbiome in Great tits. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-134>
- Liu, H., Zhu, J., Hu, Q., & Rao, X. (2016). *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. En *International Journal of Infectious Diseases* (Vol. 50, pp. 10-17). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.07.006>
- Miles, T. D., McLaughlin, W., & Brown, P. D. (2006). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. *BMC Veterinary Research*, 2, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-2-7>
- Ouwehand, A. C., Forssten, S., Hibberd, A. A., Lyra, A., & Stahl, B. (2016). Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. *Annals of Medicine*, 48(4), 246-255. <https://doi.org/10.3109/07853890.2016.1161232>
- Pearce, D. S., Hoover, B. A., Jennings, S., Nevitt, G. A., & Docherty, K. M. (2017). Morphological and genetic factors shape the microbiome of a seabird species (*Oceanodroma leucorhoa*) more than environmental and social factors. *Microbiome*, 5(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0365-4>
- Poulsen, L. L., Thøfner, I., Bisgaard, M., Christensen, J. P., Olsen, R. H., & Christensen, H. (2017). Longitudinal study of transmission of *Escherichia coli* from broiler breeders to broilers. *Veterinary Microbiology*, 207, 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.05.029>
- Prabhurajeshwar, C., & Chandrakanth, R. K. (2017). Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. *Biomedical Journal*, 40(5), 270-283. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.06.008>

- Rodríguez-Ruano, S. M., Martín-Vivaldi, M., Martín-Platero, A. M., López-López, J. P., Peralta-Sánchez, J. M., Ruiz-Rodríguez, M., Soler, J. J., Valdivia, E., & Martínez-Bueno, M. (2015). The hoopoe's uropygial gland hosts a bacterial community influenced by the living conditions of the bird. *PLoS ONE*, *10*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139734>
- Ruiz-Rodríguez, M., Martínez-Bueno, M., Martín-Vivaldi, M., Valdivia, E., & Soler, J. J. (2013). Bacteriocins with a broader antimicrobial spectrum prevail in enterococcal symbionts isolated from the hoopoe's uropygial gland. *FEMS Microbiology Ecology*, *85*(3), 495-502. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12138>
- Ruiz-Rodríguez, M., Soler, J. J., Martín-Vivaldi, M., Martín-Platero, A. M., Méndez, M., Peralta-Sánchez, J. M., Ananou, S., Valdivia, E., & Martínez-Buenob, M. (2014). Environmental factors shape the community of symbionts in the hoopoe uropygial gland more than genetic factors. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(21), 6714-6723. <https://doi.org/10.1128/AEM.02242-14>
- Scheutz, F., & Strockbine, N. A. (2015). *Escherichia*. En *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-49). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01147>
- Shawkey, M. D., Pillai, S. R., Hill, G. E., Siefferman, L. M., Roberts, S. R., D Bennett, A. T., & Théry, M. (2007). Bacteria as an Agent for Change in Structural Plumage Color: Correlational and Experimental Evidence. *journals.uchicago.edu*, *169*(SUPPL.). <https://doi.org/10.1086/510100>
- Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., MacKichan, J., Kato-Maeda, M., Miller, S., Nadarajan, R., Brodie, E. L., & Lynch, S. V. (2015). Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS ONE*, *10*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117617>
- Subedi, M., Luitel, H., Devkota, B., Bhattarai, R. K., Phuyal, S., Panthi, P., Shrestha, A., & Chaudhary, D. K. (2018). Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal. *BMC Veterinary Research*, *14*(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1442-z>

- Suez, J., Zmora, N., Zilberman-Schapira, G., Mor, U., Dori-Bachash, M., Bashardes, S., Zur, M., Regev-Lehavi, D., Ben-Zeev Brik, R., Federici, S., Horn, M., Cohen, Y., Moor, A. E., Zeevi, D., Korem, T., Kotler, E., Harmelin, A., Itzkovitz, S., Maharshak, N., ... Elinav, E. (2018). Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT. *Cell*, 174(6), 1406-1423.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.047>
- Tarradas, J., Tous, N., Esteve-garcia, E., & Brufau, J. (2020). The control of intestinal inflammation: A major objective in the research of probiotic strains as alternatives to antibiotic growth promoters in poultry. En *Microorganisms* (Vol. 8, Número 2, p. 148). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020148>
- Tellez, G., Luis, J., Novozymes, V.-S., Torres, A., Wolfenden, A. D., Pixley, C. M., Higgins, J. P., Higgins, S. E., Vicente, J. L., Torres-Rodriguez, A., Hargis, B. M., & Tellez, G. (2007). Evaluation of Spray Application of a Lactobacillus-based Probiotic on *Salmonella enteritidis* Colonization in Broiler Chickens. *International Journal of Poultry Science*, 6(7), 493-496. <https://doi.org/10.3923/ijps.2007.493.496>
- Varga, C., Brash, M. L., Slavic, D., Boerlin, P., Ouckama, R., Weis, A., Petrik, M., Philippe, C., Barham, M., & Guerin, M. T. (2018). Evaluating Virulence-Associated Genes and Antimicrobial Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates from Broiler and Broiler Breeder Chickens in Ontario, Canada . *Avian Diseases*, 62(3), 291-299. <https://doi.org/10.1637/11834-032818-reg.1>
- Whittaker, D. J., Slowinski, S. P., Greenberg, J. M., Alian, O., Winters, A. D., Ahmad, M. M., Burrell, M. J. E., Soini, H. A., Novotny, M. V, Ketterson, E. D., & Theis, K. R. (2019). *Experimental evidence that symbiotic bacteria produce chemical cues in a songbird*. <https://doi.org/10.1242/jeb.202978>
- Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., & Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0536-0>
- Zhao, C., Tang, N., Wu, Y., Zhang, Y., Wu, Z., Li, W., Qin, X., Zhao, J., & Zhang, G. (2012). First reported fatal *Morganella morganii* infections in chickens. *Veterinary*

Microbiology, 156(3-4), 452-455. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.021>