

TESIS DEFENDIDA POR

Ana Claudia Sánchez Ortiz

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Jorge Olmos Soto
Director del Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Miembro del Comité

Dr. Jose De Jesús Paniagua Michel

Miembro del Comité

Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera

Miembro del Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua
Chavez

*Coordinador del programa de posgrado en
Ciencias con Orientación en Biotecnología
Marina*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

*Encargado del Despacho de la Dirección de
Estudios de Posgrado*

21 de Septiembre de 2009.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

ATENUACIÓN DE COCCIDIOSIS EN POLLOS MEDIANTE EL USO DE *Bacillus subtilis* COMO PROBIÓTICO

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

ANA CLAUDIA SÁNCHEZ ORTIZ

Ensenada, Baja California, México, Septiembre del 2009.

RESUMEN de la tesis de **Ana Claudia Sánchez Ortiz**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias con orientación en **Biotecnología Marina**. Ensenada, Baja California. Septiembre del 2009.

ATENUACIÓN DE COCCIDIOSIS EN POLLOS MEDIANTE EL USO DE *Bacillus subtilis* COMO PROBIÓTICO

Resumen aprobado por:

Dr. Jorge Olmos Soto

La producción de pollos (*Gallus gallus*) es una industria de gran importancia a nivel mundial y en la que México ocupa el quinto lugar de producción. Sin embargo, la industria avícola se enfrenta a muchas enfermedades que ocasionan pérdidas millonarias. Entre éstas se encuentra la coccidiosis, causada por siete especies parasíticas intracelulares obligadas del género *Eimeria*. Los principales métodos para atacar la infección constan de vacunas, drogas e ionóforos, que pueden generar reversión de la patogenicidad y resistencia a los tratamientos, ocasionando cierto daño al organismo. Bajo dichos criterios se ha considerado la búsqueda de organismos probióticos que mejoren el desempeño de los pollos. *Bacillus subtilis* es una bacteria gram positiva de fácil manejo, cuyo potencial como probiótico ya ha sido probado. Se realizaron bioensayos con cepas de *B. subtilis* denominadas LM-4, LM-6, LM-7 y WT en medio LB suplementado con leche descremada al 1.6%, 0.5% de almidón y en medio AL con 2.5% peso/volumen de aceite de olivo o maíz. También se midió crecimiento en medio LB sólido, y se determinó la capacidad enzimática de las cepas en los diferentes sustratos en un rango de pH de 5.5 a 7.5, y a 37° y 41° C. Se seleccionó la cepa LM-4 por su crecimiento, producción enzimática (proteasas, carbohidrasas y lipasas), resistencia a pH y temperatura y sus capacidades antimicrobianas. Se distribuyeron 300 pollos de engorda de un día de nacidos en ocho tratamientos para probar el potencial de la cepa LM-4 mediante la valoración del estado de salud y productivo de los pollos. Los pollos alimentados con el probiótico mostraron un peso promedio final mayor al resto de los grupos. La concentración de los parámetros plasmáticos indicó que no hubo modificación en el patrón fisiológico regular de los pollos. Se observó una diferencia muy significativa en el índice de lesiones y la liberación de ooquistes del tratamiento con probiótico y el control no tratado desafiado. El índice anticoccidial alcanzado por el probiótico fue bueno (187.71). La adición de *B. subtilis* mejoró el estado de salud general de los pollos desafiados con coccidia, permitiendo también una mayor producción de interés económico.

Palabras Clave: *Bacillus subtilis*, probiótico, coccidia.

ABSTRACT of the thesis presented by **Ana Claudia Sánchez Ortiz** as a partial requirement to obtain the MASTER degree in Ciencias con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California, México mes y año.

ATTENUATION OF COCCIDIOSIS IN CHICKENS BY THE USE OF *Bacillus subtilis* AS PROBIOTIC

The Chicken (*Gallus gallus*) industry is of worldwide importance and Mexico is the fifth leading producer in the world. However, this industry faces many illnesses that cause the loss of millions of dollars. Among these illnesses we found coccidiosis, caused by seven intracellular obligate parasitic species of the genus *Eimeria*. The main methods to control the infection consist of vaccines and drugs that can generate reversion of the pathogenicity and resistance to the treatments, causing certain damage to the organism. Under this approach it has been considered the search of probiotics that improve the performance of the chickens. *Bacillus subtilis* is a gram positive bacterium, easy handle and whose potential as a probiotic has already been proven. Biotests with strains of *B. subtilis* denominated LM-4, LM-6, LM-7 and WT were carried out in LB supplemented with Skim Milk to 1.6%, 0.5% of starch and 2.5% w/v of olive or corn oil. Growth was also measured on solid LB, and the enzymatic capacity of the strains was determined in the different substrates at pH ranging from 5.5 to 7.5, and a temperature between 37° and 41° C. The strain LM-4 was selected by its growth, enzymatic production (proteases, carbohydrases and lipases), resistance to pH and temperature, and its antimicrobial capacities. 300 one day old chickens were distributed in eight treatments to prove the potential of the strain LM-4 by means of the evaluation of the performance and productivity of the chickens. The chickens fed with the probiotic, on average, weighed more than those who were not fed probiotic. The concentration of the plasmatic parameters indicated that there was no modification in the regular physiologic pattern of the chickens. A very significant difference was observed in the index of lesions and the liberation of oocysts of the treatment with probiotic and the control not treated, challenged. The anticoccidial index reached by the probiotic was good (187.71). The addition of *B. subtilis* improved the general health of the chickens challenged with coccidia and increased the production of economical importance.

Key Words: *Bacillus subtilis*, probiotics, coccidia.

**A LA MEMORIA DE MI HERMANA, QUE NACIO LIBRE, COMO EL
VIENTO Y SE MOVIA POR INSTINTO, COMO UN GORRIÓN.**

Dedicatorias

PORQUE NO SE PUEDE VOLAR SIN ALAS

A MIS PADRES POR PERMITIRME SOÑAR

PORQUE NO SE PUEDE VER SIN LUZ

**A MIS SOBRINOS LALO Y RICARDO POR
ILUMINAR MI VIDA**

PORQUE LA FE NOS IMPULSA A SOÑAR

A STITCH POR UNA GOTA DE ILUSIÓN.

A LA VIDA PORQUE ME HA DADO TODO PARA SER FELIZ.

Agradecimientos

PORQUE EL CAMINO ES MAS FÁCIL EN COMPAÑÍA DE QUIEN QUEREMOS...

PORQUE ES MAS FÁCIL LEVANTARSE CUANDO ALGUIEN TE TIENDE LA MANO...

Y PORQUE EL AGRADECIMIENTO ES LA MEMORIA DEL CORAZÓN...

Gracias a mis padres porque sin su apoyo nada de esto hubiese sido posible. Gracias por cada momento, cada regaño, cada palabra de aliento. Porque sólo ustedes tienen esa fe que mueve montañas, esa fuerza para lograrlo todo... gracias por creer en mí y no permitirme desistir. Gracias a los dos por poner a la familia ante todo y apoyar a sus hijos a pesar de todo.

Gracias a mi hermano precioso y consentido, Lalo, por ser tan grande siendo tan pequeño.

Gracias a Ricardo por sus locuras y ocurrencias, pero a la vez su gran ternura que es como una inyección de vida y alegría.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por proporcionar los recursos que auspiciaron el proyecto que me permitió realizar este trabajo.

Muchas gracias a mi director, Dr. Jorge Olmos, por creer en mi, brindarme su tiempo y darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto, que si bien no abarcó todo lo que esperábamos para mi representó un gran aliento en mi futuro como investigador.

Gracias a CICESE por darme el espacio para crecer, así como al personal docente, técnico, administrativo y compañeros que entraron conmigo a la maestría y que forman parte de este centro y que de alguna u otra manera formaron parte en mi camino transcurrido en estos dos años de esfuerzo, tristezas y alegrías. Muchísimas gracias a mis sinodales por su tiempo y dedicación.

Muchas gracias Natalia por apoyarme en los momentos más difíciles aunque a veces quería ahorcarte, pero muchas otras me dabas un gran aliento.

A Mónica y Lizeth por ofrecerme un refugio al que siempre puedo volver.

Gracias a la ayuda muy amablemente brindada a pesar de su falta de tiempo de Héctor Cordova.

Gracias a todos los que forman parte del laboratorio de Microbiología Molecular, a mis compañeros por hacer más amenas las horas en laboratorio.

Muchas gracias a todos lo que me apoyaron con algún aspecto técnico o logístico durante la realización de este trabajo como: Abigail y Abelardo por su gran apoyo que me ayudó mucho en el trabajo en varias ocasiones; el Biólogo Lauro Trejo y su hija Maryangela que me ofrecieron el espacio y apoyo para elaborar los tratamientos; al apoyo de René Loperena y Q.F.B. Lidia G. Martínez por su contribución a la elaboración de este proyecto.

A todos aquellos, familiares y amigos que, aunque no menciono puntualmente, tienen un lugar en mi vida y en mi mente, que han confiado en mi y estuvieron conmigo en las malas y en las buenas, en momentos de estrés y desde luego también en los buenos, para todos ustedes gracias!!!

“La felicidad no está en hacer lo que quieres sino en querer lo que haces”.

CONTENIDO

	Página
Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	v
Contenido.....	vii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tablas.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II.1 Producción avícola en México.....	3
II.2 Coccidiosis.....	6
II.3 Esfuerzos anticoccidiosis.....	8
II.4 Probióticos.....	10
II.5 Vacunas recombinantes.....	12
II.6 Biovectores de entrega.....	13
II.7 <i>Bacillus subtilis</i>	15
II.8 <i>B. subtilis</i> como Probiótico.....	17
II.9 Otros beneficios derivados del uso de <i>B. subtilis</i>	18
II.10 <i>B. subtilis</i> Como Vector Recombinante.....	19
II.10.A) Para expresión de antígenos.....	19
II.10.B) Para despliegue de antígenos en esporas.....	20
III. JUSTIFICACIÓN.....	22
IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	23
V. OBJETIVOS.....	24
V.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
V.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25

CONTENIDO (continuación)

	Página
VI.1 Selección de cepas por sus potenciales enzimáticos.....	25
VI.1.A) <i>Proteasas</i>.....	25
VI.1.B) <i>Carbohidrasas</i>.....	26
VI.1.C) <i>Lipasas</i>.....	26
VI.2 Selección por resistencia ambiental a pH y temperatura.....	27
VI.3 Selección de cepas por sus potenciales antimicrobianos.....	29
VI.4 Alimento.....	30
VI.5 Aditivos.....	31
VI.6 Tratamientos.....	31
VI.7 Parámetros Productivos de Respuesta a los Tratamientos.....	34
VI.7.A) <i>Ganancia porcentual de peso</i>.....	34
VI.7.B) <i>Conversión de alimento</i>.....	35
VI.7.C) <i>Supervivencia</i>.....	35
VI.8 Parámetros Fisiológicos de Respuesta a los Tratamientos.....	35
VI.9 Parámetros de potencial anticoccidial.....	36
VI.9.A) <i>Cuantificación de ooquistes</i>.....	36
VI.9.B) <i>Cálculo del índice anticoccidial</i>.....	36
VI.10 Desafío.....	37
VI.11 Sistema Biovector de Entrega.....	38
VI.12 Diseño de oligonucleótidos.....	38
VI.13 Extracción de DNA cromosomal.....	40
VI.14 Amplificación de <i>cotC</i>, <i>cotB</i>.....	42
VII. RESULTADOS	45
VII.1 Selección de cepas por sus potenciales enzimáticos.....	45
VII.1.A) <i>Proteasas</i>.....	46
VII.1.B) <i>Carbohidrasas</i>.....	46
VII.1.C) <i>Lipasas</i>.....	46
VII.2 Selección por resistencia ambiental a pH y temperatura.....	47
VII.3 Selección de cepas por sus potenciales antimicrobiales.....	49
VII.4 Parámetros Productivos de Respuesta a los Tratamientos.....	51
VII.4.A) <i>Ganancia porcentual de peso</i>.....	51
VII.4.B) <i>Conversión de alimento</i>.....	53
VII.4.C) <i>Sobrevivencia</i>.....	56
VII.5 Parámetros Fisiológicos de Respuesta a los Tratamientos.....	58
VII.6 Parámetros de potencial anticoccidiano.....	60
VII.6.A) <i>Lesiones intestinales</i>.....	60
VII.6.B) <i>Cuantificación de ooquistes</i>.....	62
VII.6.C) <i>Cálculo del índice anticoccidial</i>.....	67
VII.7 Sistema biovector de entrega.....	68

CONTENIDO (continuación)

	Página
VII.8 Extracción de DNA cromosomal.....	69
VII.9 Amplificación de <i>cotC</i>, <i>cotB</i>.....	69
VIII. DISCUSIÓN.....	71
VIII.1 Selección de cepas por sus potenciales enzimáticos.....	72
VIII.1.A) <i>Proteasas</i>.....	74
VIII.1.B) <i>Carbohidrasas</i>.....	77
VIII.1.C) <i>Lipasas</i>.....	78
VIII.2 Resistencia ambiental a pH y temperatura.....	79
VIII.3 Potencial antimicrobiano.....	80
VIII.4 Parámetros productivos.....	82
VIII.5 Parámetros fisiológicos.....	84
VIII.6 Parámetros anticoccidiales.....	88
VIII.7 Antibióticos.....	91
VIII.8 Sistema biovector de entrega.....	93
IX. CONCLUSIONES.....	94
X. RECOMENDACIONES.....	95
XI. LITERATURA CITADA.....	96

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		Página
1	Producción en miles de toneladas de los principales países productores de pollo en el 2007, encontrada en http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=74&Itemid=97	3
2	Valor de la principal producción avícola en México, encontrada en http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=61&Itemid=84	4
3	Producción de pollos en México a lo largo de 15 años, de 1994 al 2008, encontrada en http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=65&Itemid=88	4
4	Producción total anual de huevo en México del año 1994 al 2008, encontrada en http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=64&Itemid=87	5
5	Producción en miles de cajas de los principales países productores de huevo en el 2007, encontrada en http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=73&Itemid=96	5
6	Papel en porcentaje de la avicultura respecto a la producción pecuaria total en México, fuente: http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=60&Itemid=83	6
7	Curva de crecimiento de la cepa LM-4 en el medio de esporulación Schaeffer a 300 rpm con una temperatura de 37° C...	49
8	Peso promedio correspondiente a los pollos de cada tratamiento calculado semanalmente.....	52
9	Peso promedio de los pollos de cada tratamiento obtenido al final del experimento, el día 42.....	53

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
10	Consumo de alimento promedio diario por pollo para cada uno de los siete tratamientos B-H y los dos controles A e I.....	55
11	Número de pollos sobrevivientes al final del experimento y número total de decesos encontrados en cada corral, A-I.....	57
12	Concentraciones plasmáticas de: A) Glucosa, B) Creatinina, C) Colesterol, D) Triglicéridos, E) Bilirubina total, F) Bilirubina directa, G) Calcio, H) LDH, I) AST, J) Proteínas totales, K) Albúmina y L) Globulina, de las muestras tomadas los días 14, 28 y 42.....	58
13	Esquema del plásmido pDG1662, mostrando la ubicación de las enzimas de restricción BamHI y EcoRV y la porción correspondiente a amyE.....	68
14	Gel de agarosa al 1.2% donde se observan los productos de PCR correspondientes a: carril 1: <i>cotB</i> amplificado de BB80 con los oligos 5'BBHI y 3'BNA4; carril 2: <i>cotB</i> amplificado de LM-4 con los oligos 5'BBHI y 3'BNA4; carril 3: <i>cotB</i> amplificado de BB80 con los oligos 5'BBHI y 3'BTA4; carril 4: <i>cotB</i> amplificado de LM-4 con los oligos 5'BBHI y 3'BTA4; carril 5: escalera (los números indican las pares de bases a que equivale cada banda); carril 6: <i>cotC</i> amplificado de BB80 con los oligos 5'CBHI y 3'CNA4; carril 7: <i>cotC</i> amplificado de LM-4 con los oligos 5'CBHI y 3'CNA4; carril 8: <i>cotC</i> amplificado de BB80 con los oligos 5'CBHI y 3'CTA4; carril 9: <i>cotC</i> amplificado de LM-4 con los oligos 5'CBHI y 3'CTA4; carril 10: control, amplificado de LM-4 con los oligos 5'16SF y 3'Bseq1, para identificación del género <i>Bacillus</i>	70

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla</i>		Página
I	Composición porcentual en la constitución de la dieta basal sin probiótico.....	30
II	Tratamientos para la alimentación de los pollos, todos parten de la dieta basal.....	33
III	Cantidad de ooquistes por especies correspondientes a una dosis por ave.....	38
IV	Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las secuencias codificadoras para las proteínas de cubierta y las secuencias antigénicas.....	40
V	Combinación de oligos correspondientes a las posiciones 5' y 3' que se emplearon para cada reacción de PCR con el DNA correspondiente. Las primeras cuatro combinaciones se emplearon para la amplificación de las proteínas de cubierta de <i>B. subtilis</i> y las combinaciones 5 a 8 para las proteínas antigénicas de coccidia. En la última columna se muestra el tamaño esperado de los fragmentos.....	43
VI	Reactivos por cada reacción de PCR.....	44
VII	Protocolo de amplificación.....	44
VIII	Resumen de los resultados obtenidos en los bioensayos enzimáticos...	47
IX	Peso promedio por pollo correspondiente a cada tratamiento. D= día..	51
X	Ganancia de peso G.P. semanal (S 1 a 6) y ganancia de peso diario G.P.D. calculada a partir del peso semanal de los pollos de cada uno de los tratamientos.....	52
XI	Alimento promedio en gramos consumido semanalmente por ave y consumido diario por cada pollo en cada uno de los nueve tratamientos, A a I, durante las seis semanas de experimento.....	54
XII	Conversión alimenticia dado como el alimento consumido por pollos semanalmente entre el peso ganado por pollo por semana para cada uno de los tratamientos.....	56

LISTA DE TABLAS (continuación)

<i>Tabla</i>	Página	
XIII	Número de decesos semanales para cada tratamiento, A a I, contabilizados durante los 42 días de tratamiento. S=Semana; %= Porcentaje de supervivencia; N _{final} = número de individuos que sobrevivieron al final del experimento.....	57
XIV	Valores de pH para las diferentes porciones intestinales: D=duodeno, Y=yeyuno, Í=íleon y C=ciegos, correspondientes a las necropsias por tratamiento.....	59
XV	Índice de lesiones intestinales ocasionadas por las diferentes especies de <i>Eimeria</i> encontradas en cinco pollos seleccionados aleatoriamente el día 28 de tratamiento.....	61
XVI	Porcentaje de lesiones observadas en cada porción intestinal de los pollos sacrificados el día 28 de tratamiento.....	62
XVII	Número de ooquistes por gramo de heces correspondiente a las diferentes especies del género <i>Eimeria</i> , las muestras fueron tomadas de cada corral el día siete de tratamiento (semana 1).....	63
XVIII	Número de ooquistes por gramo de heces correspondiente a las diferentes especies del género <i>Eimeria</i> , las muestras fueron tomadas de cada corral el día 14 de tratamiento (semana 2).....	64
XIX	Número de ooquistes por gramo de heces correspondiente a las diferentes especies del género <i>Eimeria</i> , las muestras fueron tomadas de cada corral el día 21 de tratamiento (semana 3).....	64
XX	Número de ooquistes por gramo de heces correspondiente a las diferentes especies del género <i>Eimeria</i> , las muestras fueron tomadas de cada corral el día 28 de tratamiento (semana 4).....	65
XXI	Porcentaje por especie de ooquistes por gramo de heces liberados el día 28 para cada uno de los tratamientos.....	65
XXII	Índice de excretas encontrada en cada corral el día 28 de tratamiento..	66
XXIII	Parámetros para el cálculo del índice anticoccidial para probar el efecto del tratamiento con probiótico en contraste con la dieta basal. IAC=Índice anticoccidial.....	67

I. INTRODUCCIÓN

Para la industria de la crianza de pollos, el principal interés es obtener productos de calidad y en cantidad suficiente para corresponder a la demanda comercial y así obtener cuantiosas ganancias. Sin embargo, la presencia de patógenos obstaculiza el proceso de crianza y constituye grandes tasas de mortandad, resumidas en cuantiosas pérdidas para la industria avícola. La coccidiosis es una de las enfermedades parasíticas más importantes en dicho sector, por lo que ha llamado la atención del núcleo científico y ha cobrado un gran interés. Por ejemplo, según el modelo de Williams (1999), el costo total por coccidiosis en pollos en el Reino Unido fue de GB£ 38, 588, 795 (76, 524, 339 USD) en 1995.

Uno de los problemas fundamentales en el tratamiento de la coccidiosis se debe a que la enfermedad es causada por más de un agente infeccioso. Los causantes de la coccidiosis en pollos son siete especies de apicomplexos parasíticos intracelulares obligados del género *Eimeria* (Brusca y Brusca, 2000).

Varios esfuerzos han sido llevados a cabo con el fin de combatir los efectos de la coccidiosis en las aves de corral para prevenir o aminorar los efectos sistémicos propios de la enfermedad como son: síntomas clínicos y carente conversión del alimento (Alfaro *et al.*, 2007).

Se han manejado básicamente dos vías profilácticas anticoccidiosis: medicamentos y vacunas. La popularidad de las drogas ha disminuido debido al desarrollo de resistencia y a los nuevos conceptos culturales de rechazo a los productos sujetos a tratamientos químicos. Por otro lado, se presentan tres tipos de vacunas que se basan en el organismo vivo y en el organismo vivo atenuado que requieren de varias infecciones consecutivas y un lapso de tres a cuatro semanas para la inducción de inmunidad protectora quedando un período intermedio de susceptibilidad a la infección. Debido a lo anterior se han probado las vacunas basadas en el organismo vivo pero tolerante a ionóforos, que permiten tratamientos sin afectar el desarrollo de la inmunidad (Vermeulen *et al.*, 2001).

Debido a los altos costos en la producción de drogas y la generación de resistencia, y a los riesgos en emplear el patógeno para el desarrollo de vacunas, nuevos esfuerzos se han centrado en el empleo de probióticos y el desarrollo de vacunas recombinantes basadas

en una fracción inmunogénica y su entrega a través de un vector seguro y de bajo costo de producción (Watts y Kennedy, 1999; Kotton y Hohmann, 2004; Meeusen *et al.*, 2007).

En la visión del empleo de probióticos se ha contemplado a *Bacillus sp.* ya que se han comprobado algunas capacidades deseables para los productos probióticos, como inmunoestimulación y actividad antimicrobial, de algunas especies de *Bacillus* (Duc *et al.*, 2004; Oggioni *et al.*, 2003), particularmente en *B. subtilis* (Ochoa y Olmos, 2006).

El instituir un método de prevención o control de coccidiosis beneficiaría en gran manera al cultivo de pollos ya que la industria avícola se ve afectada por la baja ganancia de peso y la mortalidad que provoca la coccidia, lo cuál se refleja en grandes pérdidas económicas. En este trabajo se presenta a *B. subtilis* como un potencial probiótico con el fin de mejorar el estado de salud de pollos infectados con coccidia, posibilitando el anular el uso de antibióticos debido a la facilidad de manejo de *B. subtilis*, haciendo factible que, posteriormente, se pueda producir un tratamiento combinado con el alimento que cumpla con las características deseadas como son: bajo costo de producción, sin efectos secundarios nocivos ni modificación negativa de la microbiota intestinal regular, y que logre mejorar el estado de salud del pollo.

II. ANTECEDENTES

II.1 Producción avícola en México

México ocupa el quinto lugar en la producción mundial de pollo, *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758) (Fig.1), con una producción anual de más de 2,500 toneladas. La producción de pollos implica los mayores insumos en la industria avícola mexicana (Fig.2), con una producción de cerca de 2.8 millones de toneladas para el año 2008 (Fig.3). Esta información fue extraída de la página de la unión de avicultores mexicanos, la cuál sobresalta la importancia de esta industria a nivel mundial, y en particular para nuestro país ya que México es el principal consumidor de huevo, con una producción mayor a los 2 millones de toneladas de este producto en el 2008 (Fig.4), con lo que México ocupa el quinto lugar a nivel mundial en la producción de huevo (Fig.5). En general, la producción avícola abarca más de la mitad de la producción pecuaria (Fig.6) total del país.

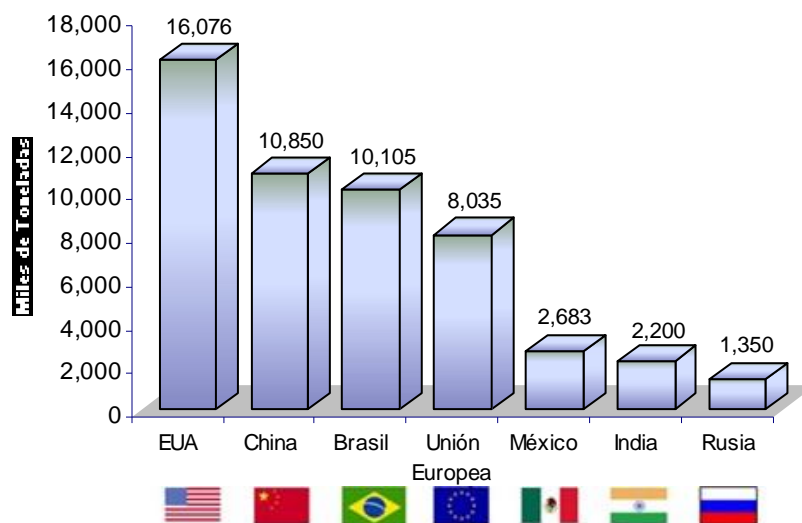


Figura 1.- Producción en miles de toneladas de los principales países productores de pollo en el 2007, datos tomados de: http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=74&Itemid=97.

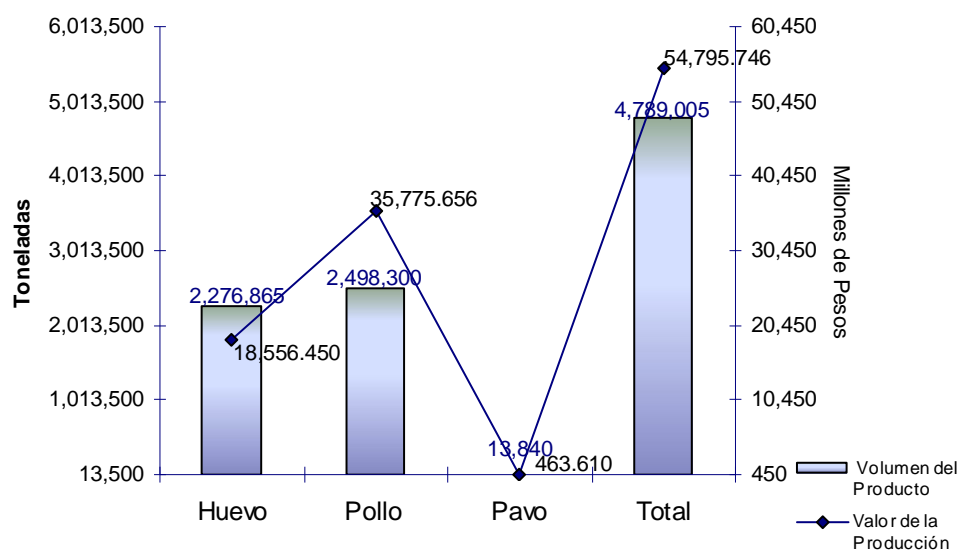


Figura 2.- Valor de la principal producción avícola en México, datos tomados de:
http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=61&Itemid=84.

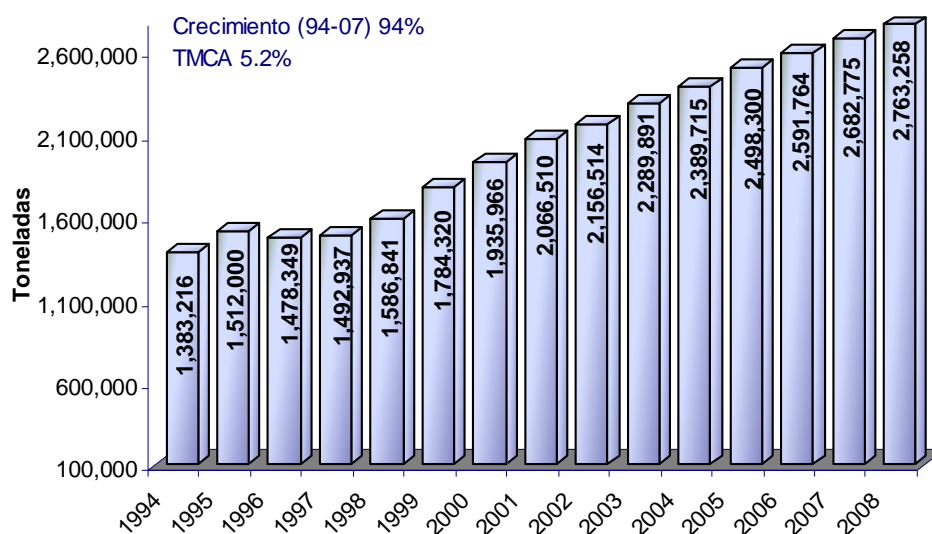


Figura 3.- Producción de pollos en México a lo largo de 15 años, de 1994 al 2008, datos tomados de:
http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=65&Itemid=88.

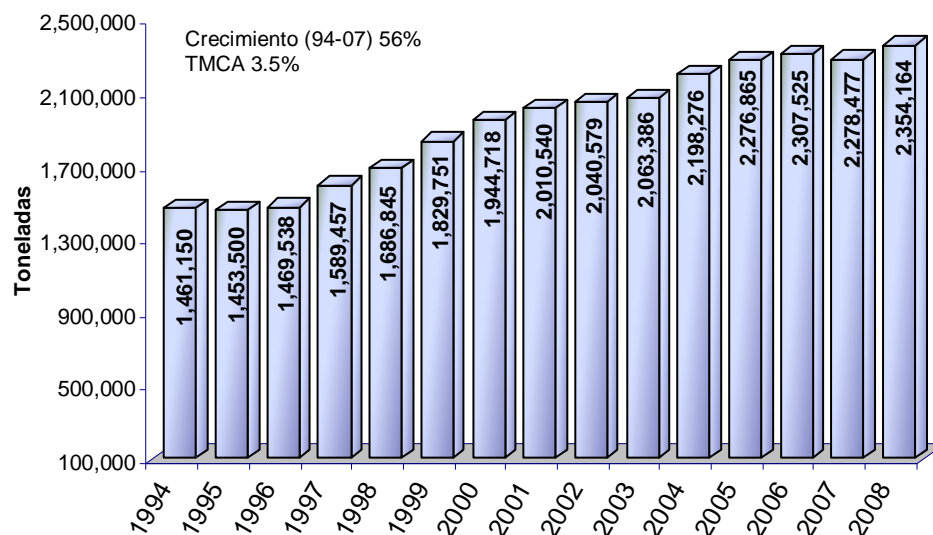


Figura 4.- Producción total anual de huevo en México del año 1994 al 2008, datos tomados de: http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=64&Itemid=87

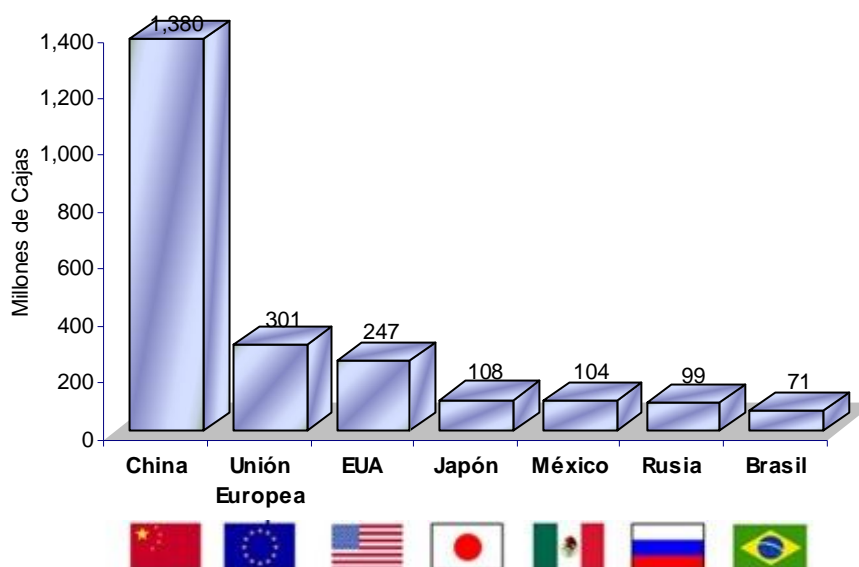


Figura 5.- Producción en miles de cajas de los principales países productores de huevo en el 2007, datos tomados de: http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=73&Itemid=96

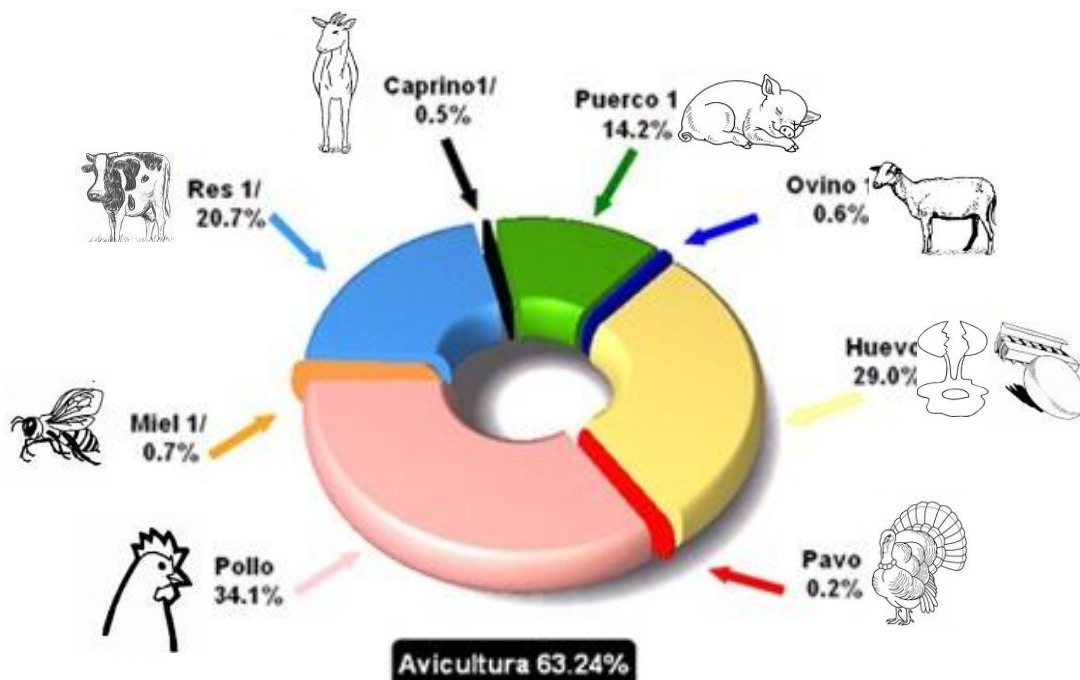


Figura 6.- Papel en porcentaje de la avicultura respecto a la producción pecuaria total en México, fuente: http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=60&Itemid=83.

II.2 Coccidiosis

El ciclo de vida de *Eimeria* (Eukaryota; Alveolata; Apicomplexa; Coccidia; Eimeriorina; Eimeriidae; *Eimeria* Schneider, 1875) comienza con el ingreso de los quistes al organismo del huésped, a través del alimento y el agua, seguido por la infección de células epiteliales de la mucosa de determinadas porciones del tejido intestinal donde se implantan los esporozoitos en un lapso de 24 horas después de que los pollos ingirieron los ooquistes, para después reproducirse asexualmente de 2-4 generaciones (determinado genéticamente para cada especie) formando merozoitos. Cada esporozoito libera alrededor de mil merozoitos. La última generación de merozoitos forma gametogonias que darán lugar a macrogametos y microgametos los cuales salen de la célula para formar un oquiste (fase sexual) que saldrá por las heces y quedará latente para una nueva infección (Brusca y Brusca, 2000).

Los linfocitos intestinales intraepiteliales son los primeros en responder ante la presencia de los esporozoitos, los cuáles se valen del complejo apical (roptries y micronemas) para la invasión al hospedero. Los parásitos producen antioxidantes tales como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa para combatir el superóxido y el óxido nítrico producido por las células del sistema inmune (macrófagos) en respuesta a las citocinas producidas. Algunas especies de *Eimeria* tienen un ciclo de manitol para protegerse del ambiente oxidante, al parecer estos parásitos se pueden mostrar como anaerobios facultativos. Por lo tanto, el estrés oxidativo juega un papel relevante en aspectos reguladores y de interacción durante la infección. El sistema inmune de la mucosa está compuesto principalmente por los tejidos linfoides asociados a ésta (para destruir la invasión del patógeno y evitar su expansión) y los asociados al intestino (presentación y procesamiento de antígenos, producción de anticuerpos y células del sistema inmune) (Min *et al.*, 2004).

La coccidiosis es una enfermedad muy común entre las granjas avícolas de todo el mundo. Uno de sus principales efectos es la poca ganancia en peso que manifiestan los pollos, debida en parte, a las lesiones intestinales que produce el parásito, que se pueden presentar a varios niveles, dependiendo del grado de contaminación de oquistes, pudiéndose observar una gran concentración de ooquistes desde los 28 días de edad de los pollos (Salinas *et al.*, 2001) dependiendo de las condiciones de crianza.

El desarrollo de la infección se ve afectado por diferentes factores propios de los organismos hospederos tales como la edad (los más jóvenes se dice que son menos susceptibles) así como por determinantes genéticos (potencial inmunogénico); por otro lado se encuentran las determinantes propias de las interacciones interespecíficas entre miembros del género *Eimeria* con otros organismos patógenos (Ej. *Clostridium perfringens*) (Vermeulen *et al.*, 2001). Además se reconocen diferentes grados de patogenicidad: coccidiosis clínica, en la cuál se presentan los síntomas clínicos tales como diarrea, sangre en heces e incluso muerte; coccidiosis subclínica, en ésta los signos del grado de infección no son tan conspicuos, pero sí se puede medir una disminución en la ganancia de peso, dada por la mala absorción del alimento provocada por la infección;

finalmente, el menor grado de infección se denomina coccidiasis donde la pequeña cantidad de parásitos infectivos no produce ningún efecto adverso.

Al parecer, también el ambiente influye sobre el grado de infección, favoreciendo los ambientes húmedos al desarrollo del parásito, además del desarrollo de resistencia a anticoccidianos, como observaron Moreno y colaboradores (2001), quienes encontraron una alta recurrencia de coccidiosis en granjas avícolas en Tehuacan, Puebla, donde encontraron mayor frecuencia de *E. tenella*, seguida de *E. brunetti*, *E. maxima* y *E. acervulina*, ésta última en menor cantidad pero en todas las granjas.

Aunado a lo anterior, estos parásitos presentan un ciclo de vida complejo que involucra distintos estadios que, por ende, no pueden ser atacados de la misma manera, por lo que se busca una mejor comprensión de los complejos proteicos del parásito involucrados en la invasión (Sasai, 1998), así como agentes inmunes transferidos a los pollos por herencia materna (Smith, 1998).

II.3 Esfuerzos anticoccidiosis

El uso de coccidiostáticos químicos conlleva ciertos efectos secundarios como anomalías en el sabor, color o calidad del huevo, mortalidad embrionaria o incubabilidad, aunque se están manejando programas químico-ionóforo que ofrecen mejores perspectivas (Tovar, 2002).

El desarrollo de vacunas pretende eliminar o disminuir el uso de químicos antiparasitarios debido a que los parásitos pueden desarrollar resistencia a la droga. Por lo tanto se buscan vacunas seguras, sin residuos químicos, que no tengan ningún efecto ambiental, pero que pudieran ser baratas, efectivas y fáciles de administrar como lo son las drogas. Estas vacunas consisten principalmente en el mismo parásito vivo o atenuado, cuya producción es intensiva y cara. En el caso de coccidiosis las vacunas abarcan más de \$300 millones del mercado de las vacunas antiparasitos, de las cuáles Coccivac e Immucox se basan en el organismo completo vivo, mientras que Paracox y Livacox se basan en el parásito atenuado, con gran costo de producción y variaciones en su eficacia, además del peligro de reversión de la virulencia y de que el desarrollo de la inmunidad protectora

inducida por la vacuna se tarda de dos a cuatro semanas (Tomley *et al.*, 1998; Dalton y Mulcahy, 2001).

La eficacia de las vacunas vivas depende del modo de entrega, de modo que se asegure el suministro al organismo de la dosis necesaria para producir el efecto inmunogénico. Entre las formas de vacunación para la inoculación oral se encuentra la adición de la vacuna en el agua, la cuál es la más común; rociada directamente sobre la comida; mediante un gel comestible; o inoculación ocular mediante el rocío de ooquistes directamente al ojo; e incluso introducción directamente en el huevo. Las diferencias en el modo de inoculación acarrear consecuencias en el tiempo e intensidad de la respuesta. La reproducción del parásito inoculado es importante para determinar la eficacia de la vacuna así como el enquistamiento, el cuál depende de la edad del ave. Además se menciona la importancia de la temperatura, más que de la humedad, para la esporulación (25-28°). Entre mayor sea la densidad de pollos en el área de crianza, mayor será la acumulación de ooquistes, e incluso la eficacia de las vacunas vivas también puede verse afectada a causa de la inmunovariabilidad entre cepas de *Eimeria* y la presencia de otros patógenos (Chapman *et al.*, 2002).

Supercox es un ejemplo de vacuna, ya antes mencionada, consistente en una línea no atenuada de *E. maxima* (alta inmunogenicidad) y *E. acervulina* (baja patogenicidad) y una línea atenuada de *E. tenella*. Estas tres especies son las encontradas más comúnmente en aves producidas en granjas en China, el segundo mayor productor avícola a nivel mundial. El hecho de manejar líneas atenuadas incrementa el costo de producción. Dada su alta patogenicidad es necesaria la atenuación de *E. tenella*. Esta vacuna ofrece ventajas sobre el uso de drogas anticoccidiales (Diclazuril) ya que incrementa significativamente la tasa de supervivencia y disminuye también de manera significativa la pérdida en peso de las aves rechazadas por la planta procesadora, probando una fuerte respuesta inmune con un menor costo de producción (Suo *et al.*, 2006). Sin embargo ofrece otras desventajas, pues requiere de repetidas inmunizaciones, cierto grado de patogenicidad y requiere inoculación oral individual.

A partir de cuatro grupos experimentales con pollos desafiados, es decir expuestos a una dosis mixta de ooquistes esporulados de *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*, Juárez y

colaboradores (2007) identificaron los efectos de una vacuna anticoccidial midiendo la ganancia porcentual de peso, pH intestinal, peso total intestinal, concentración de IgA, tiempo de tránsito gastrointestinal, grado de lesiones, número de ooquistes y el porcentaje de especies. Los grupos vacunados presentaron menor ganancia en peso y presentaron una tendencia a acelerar el tránsito del alimento en el tubo digestivo antes del desafío, pero días después este tránsito fue mayor en el grupo vacunado pero que no fue expuesto a la infección. De los grupos infectados, el vacunado mostró menor severidad en las lesiones intestinales. En el grupo vacunado desafiado no se obtuvo el 100% de protección, mostrando las más severas lesiones por *E. tenella*. Los autores mencionan un menor peso intestinal del grupo vacunado no infectado por el proceso de recuperación posterior a la vacuna. Además de los efectos por recuperación postvacunal, se encontró inmunidad marginal por lo que no hubo efectividad hacia todas las especies, además de la infección cruzada.

El alternar entre vacunas y drogas e incluir un tratamiento coordinado con ionóforos puede ser efectivo para la protección inmunogénica contra coccidiosis (Chapman *et al.*, 2002); sin embargo, aunque las vacunas son la respuesta más obvia para contrarrestar la infección por coccidiosis, es necesaria la introducción de técnicas que descarten las desventajas presentes en las vacunas vivas o atenuadas como son los altos costos de producción, la dificultad de administrar la vacuna individualmente y la reversión potencial de la virulencia.

Por lo anterior es claro que se requiere del desarrollo de nuevas estrategias antiparasíticas, para lo cuál se contempla el desarrollo de vacunas recombinantes como un método alternativo para el control de la coccidiosis en pollos.

II.4 Probióticos

Según la Organización del Alimento y Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) en el 2001, se considera como probiótico a aquellos “microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del hospedero”. Por sus potenciales beneficios, la introducción de probióticos se ha extendido a la alimentación

de diversas especies como en el cultivo de camarón cuyo gran impacto a nivel mundial ha provocado la ampliación de la investigación dedicada a encontrar nuevas dietas que incrementen la producción en ganancia de peso de los camarones. En este sentido, Rengpipat y colaboradores (1998) emplearon dietas adicionadas con *Bacillus sp.* para alimentar camarón *Penaeus monodon*, encontrando que los grupos alimentados con el probiótico mostraron un incremento en peso y sobrevivencia a diferencia del grupo control, pero además comprobaron que la presencia de *Bacillus* en el intestino de los camarones impidió la infección por *Vibrio harveyi*, a diferencia del grupo control donde los camarones mostraron palidez y textura deformada, mientras que los alimentados con probiótico mostraron coloración, textura y talla normal, aunado a la mayor sobrevivencia.

Wang (2007), probó los efectos de una dieta adicionada con bacterias probióticas para el crecimiento de *P. vannamei*, basadas en una mezcla de cantidades iguales de *Rhodobacter sphaeroides* y *Bacillus sp.* Satisfactoriamente encontró un incremento en el peso final de los camarones alimentados con la dieta enriquecida con el probiótico bacteriano así como un incremento enzimático intestinal (mayor actividad proteasa, amilasa, celulasa y lipasa) con respecto a los camarones alimentados solamente con la dieta basal sin probiótico.

En la búsqueda de un buen probiótico para ser administrado en pollos de engorda, se han hecho diversos estudios con diferentes organismos con el fin de caracterizar sus capacidades potencialmente probióticas.

Pascual *et al.* (1999) probaron la capacidad de *Lactobacillus salivarius* para colonizar el tracto intestinal de pollos, al mezclar dicho organismo en el alimento, agua o inocularlo intraventricularmente. El objetivo de dicha inoculación fue el de proteger a los pollos de la colonización de *Salmonella enteritidis*, dado que es una de las principales especies causantes de la salmonelosis, una grave enfermedad en los pollos cuyo tratamiento con antibióticos causa desbalance en la microflora intestinal del hospedero y dado que las bacterias pueden generar resistencia al tratamiento. Gracias a la capacidad colonizadora de *L. salivarius*, se pudo reducir la colonización por *S. enteritidis*, ya que después de los 21 días de inoculación no observaron al patógeno, aunque también se redujo el UFC de *L. salivarius*, por lo que los autores proponen más de una inoculación.

Aspergillus oryzae ha sido probada por sus efectos sobre la digestión debido a la producción de enzimas amilolíticas y proteolíticas, también se menciona su efecto hipocolesterolémico relacionado a la producción de componentes inhibidores de la síntesis de colesterol, ocasionando una reducción de éste en el organismo del pollo, además puede modular la microflora intestinal del hospedero actuando como sustrato para bacterias favorables (Lee *et al.*, 2006).

A la fecha, las especies de *Lactobacillus* han sido el principal objeto de investigación por sus capacidades probióticas tanto para pollos como para otros organismos (Pascual *et al.*, 1999; Knarreborg *et al.*, 2002; Ryan *et al.*, 2008).

II.5 Vacunas recombinantes

Para el desarrollo de las cepas recombinantes es necesario identificar la fracción proteica que pueda servir como un eficaz inmunoestimulador para los pollos ya que la técnica se basa en inducir una respuesta inmune al imitar la infección parasítica (reconocimiento de moléculas parasíticas), además de determinar el mejor vector acarreador del antígeno.

Para la identificación de una fracción antigénica que pudiera dar a los pollos infectados la capacidad para producir una respuesta inmunológica basada en la activación de las células T, Breed y colaboradores (1999) obtuvieron ocho fracciones de proteínas hidrofílicas de esporozoitos, y obtuvieron que tres de éstas (de masa molecular relativa de <15kDa, \pm 16-25kDa y \pm 26-30kDa) produjeron la mayor respuesta proliferativa medida en base a la producción del factor activador de macrófagos (MAF) y linfocitos en sangre (PBL). Estas proteínas fueron inyectadas en grupos de 10 pollos en un volumen de 5-10 μ g de proteína/dosis, empleando Quil A como coadyuvante, donde la fracción de \pm 26-30kDa mostró la mejor respuesta por lo que puede ser considerado un buen inmunoestimulador, sin embargo, el método de entrega sólo es útil para pequeñas producciones y requiere su aislamiento y caracterización genética para poder ser empleado en la producción de recombinantes.

Vermeulen (1998) realizó una revisión acerca del progreso en el desarrollo de vacunas recombinantes contra coccidiosis donde recomienda las proteínas involucradas con el desarrollo de la infección como posibles blancos de las vacunas por su función específica. Entre estas proteínas menciona las de gránulo denso, las asociadas a micronema (Etmic-1, Etmic-2) y aquellas asociadas al cuerpo refractil. En esta revisión el autor concluye que el virus del herpes de pavos (HVT) podría ser un buen vector al ser relativamente seguro, caso contrario al empleo de *Salmonella* en la cual se han expresado antígenos recombinantes parasíticos que inducen la respuesta citotóxica de las células T.

El estadio de desarrollo de los parásitos es un factor crítico para la inducción de la inmunidad protectora, por ello se distinguen entre los antígenos asociados a merozoitos o estadio asexual, y aquellos antígenos de los gametocitos así como glicoproteínas de la pared de los oquistes, aunque lo ideal es emplear un antígeno que sea un constituyente interno tanto de esporozoitos como de oquistes y gametocitos, como lo son los antígenos internos contenidos en los organelos apicales y cuerpos refráctiles, éstos últimos conservados en varias especies de *Eimeria*. La acción estimuladora de células T para la respuesta inmune dependerá también del modo de entrega de las proteínas antigénicas, para lo que consideran bacterias, virus y tal vez protozoarios como vectores acarreadores de la vacuna (Ellis y Tomley, 1991; Jenkins, 1998; Vermeulen, 1998).

II.6 Biovectores de entrega

Con el fin de inducir una respuesta inmune en pollos infectados con coccidiosis Pogonka y colaboradores (2003) crearon un sistema vivo de entrega de un antígeno basado en cepas atenuadas de *S. typhimurium* recombinantes para la expresión de las proteínas del cuerpo refráctil SO7 y de TA4, proteínas localizadas en la superficie de esporozoitos de *E. tenella*, ambas proteínas fusionadas al polipéptido TetC por ser altamente inmunogénico y no tóxico. Pero además inocularon las proteínas antigénicas directamente de manera subcutánea en pollos. Mediante un ensayo ELISA los autores identificaron la presencia de IgG e IgA en menor medida en los pollos inmunizados subcutáneamente y sólo IgG en aquellas inmunizadas con *S. typhimurium* recombinante, encontrando que una sola

inmunización bastó para la inducción de anticuerpos específicos, pero sin evidencia de que el uso de *S. typhimurium* haya producido alguna diferencia.

Más tarde, Du y Wang (2005), consideraron que el uso de *S. typhimurium* como biovector estaba poco estudiado por lo que realizaron un estudio en el que probaron la inducción de respuesta humoral y de inmunidad celular en pollos infectados con *Eimeria tenella*, después de haber sido inmunizados con cepas de *S. typhimurium* como un sistema vector conteniendo el plásmido pcDNA3-5401, donde 5401 se refiere al antígeno inmunodominante del esporozoito de *E. tenella*. En este sistema determinaron la persistencia del plásmido después de 100 generaciones, y comprobaron una mayor respuesta inmune producida con dosis de 10^8 y 10^9 UFC en aves de tres días de edad, reinmunizadas dos semanas después. Aunque no encontraron diferencias significativas en cuanto al peso entre el grupo control y los tratamientos que probaron, sí encontraron una mortalidad del 10% en el control pero no entre los grupos tratados. También la proliferación de linfocitos fue significativa, sobretodo en las dosis superiores (10^8 y 10^9 UFC), que junto con una menor incidencia de daño intestinal. Esto prueba el potencial de *S. typhimurium* para ser empleado como vector de entrega de vacunas, sin embargo, primero requiere de un proceso de atenuación y el riesgo de que pueda revertir su virulencia.

Se ha manejado a *S. typhimurium* (Pogonka *et al.*, 2003; Du y Wang, 2005) entre los vectores acarreadores de vacuna anticoccidial, pero en su forma atenuada. En este aspecto se ha probado trabajar con *B. subtilis* pues, a diferencia del anterior, no representa un riesgo patogénico para los organismos sino que, por el contrario, puede ser altamente cooperativo con el hospedero.

Lactobacillus sp. ha sido ampliamente probada como probiótico (Pascual *et al.*, 1999; O'Dea *et al.*, 2006; Mountzouris *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2008) debido a abundancia en la microflora de los pollos (Abba *et al.*, 2007) por lo que Mota *et al.* (2006) aislaron especies de *Lactobacillus* presentes en pollos de engorda sanos para emplearlas como vehículos para entrega de antígenos. Para ello seleccionaron las especies a transformar en base a su capacidad de resistir *in vitro* jugos gástricos y sales biliares, su hidrofobicidad, ya que una alta hidrofobicidad puede facilitar la interacción entre la bacteria y las células del hospedero, y producción de H_2O_2 , como antibiótico ya que muchos patógenos, incluyendo

esporozitos de *Eimeria sp.* son sensibles a dicho compuesto. Para la transformación de *Lactobacillus* emplearon un plásmido de *E. coli* al cuál fusionaron dos fragmentos del gen *lbs*, empleando la proteína GFP como gen reportero indicando con una fluorescencia verde la integración de la proteína heteróloga al genoma de *Lactobacillus* por primera vez.

II.7 *B. subtilis*

B. subtilis es una bacteria con forma de bastón, al igual que el resto de las bacterias del género *Bacillus*, es gram positiva, aerobia, anaerobia facultativa, se agrupa formando cadenas y es saprófito. Se encuentra en el suelo, agua, aire y sobre diversos vegetales. Cuando se siembra sobre la superficie del agar, se pueden obtener elaboradas arquitecturas coloniales, por lo que su morfología colonial depende de las condiciones ambientales en que se desarrolle (Aguilar *et al.*, 2007). Se encuentra también como parte de la microflora intestinal de diversos organismos, entre ellos humanos (Duc *et al.*, 2004) y pollos (Lu *et al.*, 2003; Barbosa *et al.*, 2005; Teo y Tan, 2005).

Un beneficio más del empleo de *B. subtilis* deriva de la producción de esporas, las formas más resistentes de vida sobre la tierra, lo cuál garantiza su preservación incluso bajo condiciones muy adversas, como lo son los ácidos estomacales e intestinales. Las especies de *Bacillus* son cosmopolitas ya que son capaces de sobrevivir en ambientes inhóspitos creando nichos únicos en ambientes extremos gracias a la formación de esporas (Fajardo-Cavazos y Nicholson, 2006)

La espora de *B. subtilis* es una forma muy resistente, como ya se mencionó, debido a que está formada de varias capas concéntricas cuya cubierta presenta una gran complejidad. En promedio, las esporas de *B. subtilis* miden 1.2 μm de largo y 0.8 μm de ancho, el cuál puede variar debido a la humedad relativa, mostrando una serie de puentes en su superficie, la mayoría a lo largo de su eje de 85nm de espesor y una altura de aproximadamente 4nm y protuberancias de 20 a 40nm de diámetro. Estos pliegues de la cubierta se forman durante la esporulación, al deshidratarse el núcleo, y desaparecen durante la germinación, cuando la célula se hincha para dar lugar a la célula vegetal (Chada *et al.*, 2003).

La corteza está compuesta de peptidoglucano diferente al de la célula vegetativa. La cubierta presenta una capa interna laminada y una capa externa de alta densidad de electrones, formadas por un complejo de 14 tipos de proteínas. La cubierta interior está formada por 2-5 capas y tiene un espesor de 75nm, mientras que la exterior va de 70 a 200 nm de espesor. Rodeando a la cubierta exterior se puede encontrar otra capa de menor densidad de electrones fuertemente asociada con la cubierta exterior conocida como exosporio, compuesta por una mezcla de proteínas, polisacáridos complejos y lípidos. En *B. subtilis* no se han observado estructuras filamentosas asociadas a la espora como en otras especies de *Bacillus*. Entre la corteza y la cubierta interior se presenta otra capa de menor espesor que la cubierta interior pero mayor que una membrana. Aunque la cubierta de la espora está compuesta por una pequeña porción de lípidos y carbohidratos, las proteínas predominan en su composición, sobretodo proteínas ricas en tirosina y cisteína (CotB es rica en cisteína, pero además presenta una región C-terminal compuesta casi completamente de dicho aminoácido; lisina, arginina, aspartato, glutamina y tirosina son los otros aminoácidos predominantes en esta proteína). Las proteínas de la cubierta toman posiciones específicas dentro de las capas de la cubierta. Hay un gran número de proteínas de cubierta identificadas en *B. subtilis* denominadas Cot, sin embargo, mientras unas tienen un papel morfométrico preponderante (como CotE), se desconoce el papel de otras (como CotA), debido a que su ausencia no produce efectos detectables en las propiedades de la espora. La ausencia tanto de CotC como de CotB, al parecer no son requeridas para que se lleven a cabo las funciones de resistencia o germinación de la espora (Driks, 1999), sin embargo, CotB es un factor dependiente de CotE, sin un papel enzimático conocido, pero cuya ausencia puede afectar la morfología de la superficie de la cubierta de la espora alterando el patrón de los puentes formados por la contracción del núcleo durante la deshidratación, al igual que CotA, la cuál es una oxidasa (Chada *et al.*, 2003).

La presencia de L-alanina es un factor activador de la germinación en *B. subtilis* (Driks, 1999).

II.8 *B. subtilis* como Probiótico

Tras la selección y caracterización de cepas de *Bacillus* con la capacidad de producir enzimas tipo proteasas, carbohidrasas (galactosidasas, amilasas, glucosidasas) y lipasas mediante diversos ensayos sensitivos en placas de Petri, Ochoa y Olmos (2006) comprobaron los efectos probióticos de *B. subtilis*, probando en primer lugar la sobrevivencia de la bacteria, viabilidad y comportamiento metabólicamente activo al incluirla en un alimento para camarón, el cual mostró brindar el mismo crecimiento que el alimento comercial pero requiriendo menores costos de producción, mejorando el factor de conversión alimentario (FCA) y, aunque no mostró diferencia significativa en la sobrevivencia respecto a los otros tratamientos probados, sí marcó una diferencia al someterse los organismos a una prueba de resistencia al estrés por baja concentración de oxígeno. Con este trabajo se demostró que *B. subtilis* tiene potencial como probiótico ayudando al hospedero a incrementar su resistencia al estrés (Ochoa, 2006).

Duc *et al.* (2004) caracterizaron cinco productos probióticos comerciales y una cepa de *B. subtilis* para su aplicación en humanos, encontrando evidencias de colonización, inmunoestimulación y actividad antimicrobial, *B. subtilis* mostró no colonizar el tracto intestinal de los ratones inoculados y el desarrollo tanto de la célula vegetativa como esporas. Al probar la respuesta de las citocinas con los probióticos encontraron una producción temprana de IFN- γ y TNF- α en los órganos linfoides secundarios además de inducir la producción de la citosina proinflamatoria IL-6.

Comprobado el efecto probiótico de *B. subtilis* se sugiere su empleo en las dietas de organismos de interés acuicultural, sin embargo, es necesario establecer la mejor forma de administración, dosificación y calidad, pues hay productos comercializados como *B. subtilis* probiótico cuando en realidad se trata de productos basados en otras especies de *Bacillus* y no propiamente de la especie que realmente tiene esta propiedad (Green *et al.*, 1999).

II.9 Otros beneficios derivados del uso de *B. subtilis*

B. subtilis, así como otras especies de *Bacillus*, se ha empleado como agente de biocontrol (Nagórska *et al.*, 2007) y como sistemas de producción de proteínas heterólogas con fines farmacológicos, como la producción y secreción de proinsulina (Olmos y Contreras, 2003) e inmunológicos debido a sus propiedades intrínsecas al tratarse de bacterias gram positivas, ya que los productos secretados son liberados directamente al medio de cultivo, lo cual simplifica y reduce el costo de los pasos de purificación de la proteína de interés, aunque la degradación asociada a la célula afecta el campo de secreción y por tanto la eficiencia del sistema de producción pues las proteínas heterólogas producidas y secretadas estarán expuestas a un cierto grado de degradación (Jensen *et al.*, 2000).

El conocimiento genético y fisiológico que se tiene de *B. subtilis* facilita el desarrollo de sistemas de expresión genética más flexibles y controlables. Más aún, *B. subtilis* se considera en el estatus GRAS por sus siglas en inglés (Generally Regarded As Safe) es decir, que es considerada segura, por lo que no se espera que traiga consecuencias nocivas tras su consumo por humanos o animales (Ferreira *et al.*, 2005).

Finalmente, la habilidad de crecer en un medio simple y barato a una alta tasa crecimiento convierten a *B. subtilis* en un candidato ideal para la producción de moléculas bioactivas integrando el gen heterólogo dentro de su cromosoma para incrementar la estabilidad de la expresión genética, y así llevar al desarrollo de inmunoestimuladores o inmunomoduladores, es decir, vacunas vivas que eliminen el riesgo de transmisión iatrogénica de enfermedades infecciosas por la eliminación del uso de jeringas (Nicholson *et al.*, 2000; Duc *et al.*, 2003; Oggioni *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2005).

II.10 *B. subtilis* Como Vector Recombinante

II.10.A) Para expresión de antígenos

Dadas las características arriba mencionadas, se han desarrollado muchos proyectos que emplean a *B. subtilis* como vector y en los cuáles se ha comprobado la viabilidad de manejar este organismo de manera efectiva y segura.

Con el fin de incrementar los esfuerzos en el desarrollo de vacunas que ofrezcan protección en contra del ántrax, se ha empleado a *B. subtilis* como sistema productor del antígeno protector (PA), dado que otros esfuerzos de purificar dicho antígeno no lograban eliminar cualquier indicio del factor de edema (EF) y del letal (LF). Al producir una cepa de *B. subtilis* transformada con un plásmido de resistencia a la kanamicina (selección positiva) e introducir el gen de PA, Ivins y Welkos (1986) lograron obtener cepas transformantes con la capacidad de producir PA, cuya actividad biológica comprobaron al inyectar una mezcla de la cepa transformada y LF purificado, en ratones, los cuáles murieron, comprobando la actividad de PA. De la misma manera comprobaron su acción conjunta con el EF, observando enrojecimiento y edemas en los cerdos de Guinea que inyectaron. Mediante inmunizaciones con *B. subtilis* llevando el plásmido del antígeno PA, inmunizaron ratones y cerdos de Guinea y comprobaron su capacidad inmunogénica al observar las diferencias en sobrevivencia y por detección por ELISA de anti-PA tras la exposición a esporas de ántrax, en comparación con aquellos a los que sólo les inyectaron *B. subtilis* sin transformar.

En 1992, Ivins y colaboradores continúan la misma línea ya planteada por los anteriores para probar ahora la inmunización contra antrax pero ahora con adyuvantes obteniendo mayor eficacia en la respuesta inmunológica.

Debido a la propensión a la delección del gen insertado en las cepas de *B. subtilis*, Baillie, Moir y Manchee (1998), mejoraron el sistema de producción de PA empleando cepas de *B. subtilis* como vector recombinante por introducción de mutaciones específicas en los genes de los elementos reguladores Ccp-A y AbrB. También probaron con AtxA pero no obtuvieron estimulación de la expresión de PA.

II.10.B) Para despliegue de antígenos en esporas

Isticato y colaboradores (2001) emplearon esporas de *B. subtilis* en la construcción de un sistema acarreador de una molécula biológicamente activa. Para ello transformaron cepas para la expresión del fragmento C-terminal de 459 aminoácidos de la toxina del tétanos TTFC (de *Clostridium tetani*), fusionada a la proteína de cubierta de la spora CotB. Comprobaron la presencia de sus tres fusiones mediante análisis Western, junto con la expresión de CotB sin fusión; así como la expresión de dichas fusiones sobre la cubierta de la spora mediante citofluorimetría. Mediante un análisis dot blot y densitometría determinaron un estimado de 1.5×10^3 moléculas de las fusiones CotB-TTFC expresadas por spora. Más allá del éxito que obtuvieron en la expresión del sistema planteado, los autores comprobaron que la porción TTFC de la fusión CotB-TTFC mantuvo su actividad biológica al encontrar altos niveles de IgG en ratones inmunizados con dosis de 1010 esporas recombinantes.

Más tarde, basados en la construcción anterior, Duc y colaboradores (2003), probaron la respuesta oral e intranasal de cepas quiméricas, es decir, que expresaban la fusión *CotB-tetC* en el locus de *amyE* de *B. subtilis*. Por inmunofluorescencia comprobaron la presencia de la fusión en la cubierta de la spora y probaron inmunogenicidad de la misma al inmunizar ratones con dosis orales conteniendo 1.67×10^{10} esporas/dosis e intranasales conteniendo 1.11×10^9 esporas/dosis. La respuesta inmunológica fue significativa para los ratones inmunizados con las esporas recombinantes y las no recombinantes en comparación con el grupo no inmunizado, pero la presencia de IgG fue significativamente superior en esporas recombinantes en comparación con las no recombinantes y el control no inmunizado, lo mismo sucedió con la presencia de IgA. Mediante la inmunización oral los autores encontraron altos niveles de los isotipos IgG1 e IgG2b, mientras que para la inmunización intranasal predominaron las subclases IgG1, IgG2b e IgM.

Un sistema similar a los anteriores fue construido por Mauriello y colaboradores (2004) pero expandiéndose al empleo de *cotC* en vez de *cotB* para la realización de la fusión quimérica con la misma porción antigénica modelo proveniente de la toxina del

tétanos (TTFC). La fusión *cotC-tetC* fue insertada en el locus *amyE* de *B. subtilis* al igual que hicieron con la fusión *cotB-tetC*. La construcción de esporas expresando la fusión CotC-TTFC resultó ser un buen modelo para presentación antigénica ya que se observaron diferencias significativas en la producción de IgG e IgA en ratones inmunizados con suspensiones conteniendo las esporas recombinantes.

III. JUSTIFICACIÓN

Según la unión nacional de avicultores en México, en el 2008 se produjeron cerca de 2.8 millones de toneladas de carne de pollo ya que es la carne más consumida por el mexicano, además de ser los principales consumidores de huevo a nivel mundial¹ por lo que las pérdidas por coccidiosis han generado costosas consecuencias.

La solución ideal para la coccidiosis constituye el uso de vacunas efectivas, seguras, fáciles de producir y del menor costo posible, pero el trabajo de vacunar animal por animal dirige la atención hacia el empleo de alternativas que no representen un riesgo para el organismo ni confieran repercusiones secundarias, y que preferentemente puedan ser administrados con el alimento. Las características de *B. subtilis* lo hacen un candidato ideal para ser probado como un potencial probiótico atenuante de la infección.

Los problemas principales con que se debe lidiar en la lucha contra la coccidiosis radica en el número de agentes infecciosos, los diferentes puntos de infección y los estadios propios del ciclo de vida de *Eimeria sp.* Por lo que en este trabajo se pretende probar que *B. subtilis* puede atenuar el efecto parasitario de *Eimeria sp* debido a sus cualidades probióticas, inocuidad y resistencia, aunado a su relativa facilidad en su manipulación genética, el conocimiento de su genoma y facilidad de producción.

¹ <http://www.una.org.mx>

IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO

B. subtilis puede atenuar el efecto parasitario de *Eimeria sp* debido a sus cualidades probióticas frente a una infección combinada ya que el manejar dicha bacteria combinada con el alimento normal del pollo, éste mejorará su estado de salud y su crecimiento debido al incremento en la digestibilidad del alimento ocasionado por la acción de las enzimas extracelulares producidas por la bacteria, además promoverá una microflora intestinal más saludable debido a la competencia por el nicho y a la producción de antimicrobianos por parte de *B. subtilis*, además de la estimulación de una respuesta inmune disminuyendo el número de decesos y atenuando el avance de la infección por coccidiosis.

V. OBJETIVOS

V.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial de *B. subtilis* para mejorar el estado de salud y crecimiento de pollos de engorda, así como para mitigar el daño ocasionado por la infección de los parásitos pertenecientes al género *Eimeria*.

V.2 OBJETIVOS PARTICULARES

PRIMERA PARTE - SELECCIÓN DE CEPAS DE *B. subtilis*

- Seleccionar cepas de *B. subtilis* en base a su capacidad para producir enzimas tipo proteasas, carbohidrasas y lipasas extracelulares.
- Seleccionar cepas de *B. subtilis* en base a su capacidad de crecimiento y producción de enzimas tipo proteasas, carbohidrasas y lipasas a diferentes condiciones de pH y temperatura.
- Caracterizar el crecimiento de la cepa seleccionada en sus condiciones de crecimiento óptimo y al pH y temperatura presentes en el intestino de pollo.
- Determinar las capacidades antimicrobianas de la cepa seleccionada.

SEGUNDA PARTE- TRATAMIENTOS Y PARÁMETROS DE RESPUESTA

- Determinar el efecto probiótico de las cepas de *B. subtilis* en función de la supervivencia, ganancia porcentual de peso y conversión de alimento de los pollos.
- Medir pH intestinal, concentraciones plasmáticas de glucosa, proteínas totales, albúmina plasmática y alanina amino transferasa como parámetros fisiológicos para determinar la salud y estado de estrés de las aves.
- Determinar la persistencia del patógeno en pollos sanos (que no muestren ningún síntoma clínico y estén ganando peso) así como el grado de daño ocasionado por *Eimeria sp* en el tracto intestinal de pollos enfermos y cuantificación de ooquistes.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

PRIMERA PARTE.- SELECCIÓN DE CEPAS DE *B. subtilis*

VI.1 Selección de cepas por sus potenciales enzimáticos.

Para determinar la cepa de *B. subtilis* a cultivar para ser probada como probiótico, primero se realizó una selección de cepas aisladas del mar y provenientes del cepario del laboratorio de Microbiología Molecular a cargo del Dr. Jorge Olmos, crecidas durante 24 horas a 37° C en medio LB (10g bacto-tryptona, 5g extracto de bacto-levadura, 10g NaCl, 15g agar, 1L agua desionizada, pH ajustado a 7 con 250mL 1N NaOH, en autoclave a 15 libras por pulgada cuadrada en ciclo líquido), en base a la capacidad enzimática de cada colonia. Se optó por aquellas colonias capaces de producir proteasas, carbohidrasas y lipasas por lo que se trabajó con las cepas LM-4, LM-6, LM-7 y una cepa silvestre denominada WT.

Para comprobar la presencia de la actividad enzimática deseada se siguió la metodología empleada por Ochoa y Olmos (2006). En un área esterilizada se colocaron muestras de las cepas en medios de cultivo contenidos en cajas de Petri en medio LB sólido adicionadas con una fuente de alimento determinada (proteínas, carbohidratos y lípidos), y se seleccionaron aquellas que formaron un halo de degradación para cada uno de los medios, el cual se midió (en cm²) y se seleccionó el de mayor área. Los sustratos utilizados para identificar la actividad de cada tipo enzimático (proteasas, carbohidrasas y lipasas) fueron:

VI.1.A) Proteasas. Para detectar la presencia de enzimas que lleven a cabo la hidrólisis de proteínas se emplearon cajas Petri con medio LB adicionado con 1.6% de leche descremada. Se sembraron muestras de las cepas LM-4, LM-6, LM-7 y WT dibujando un punto con un asa bacteriológica sobre el medio, en área estéril al calor de un

mechero. Se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se midió el halo de degradación formado alrededor de cada colonia a las 12 y 24 horas de incubación.

VI.1.B) Carbohidrasas. Se colocaron muestras a modo de puntos de cada cepa a probar (LM-4, LM-6, LM-7 y WT) con un asa bacteriológica sobre medio LB adicionado con 0.5% almidón (5gr/L de LB). Se incubaron las cajas Petri durante 24 horas a 37°C. a las doce y 24 horas se midió el halo de degradación formado alrededor de cada punto sembrado de cada cepa. Para observar el halo se colocaron unos cuantos gránulos de yodo sobre la tapa de la caja de Petri. Con la base hacia arriba (donde se encuentra el agar) se calentó ligeramente cada caja pegándola y despegándola rápidamente a una parrilla encendida en su nivel más bajo, permitiendo que el calor ayudara a la liberación de los gases de yodo pero evitando que se quemara la caja ya que se trabajó con cajas de plástico. Los gases de yodo impregnaron el agar de un tono azul a excepción del área degradada por la bacteria, facilitando la medición de dicho halo.

VI.1.C) Lipasas. Para detectar la producción de enzimas degradadoras de lipasas se dibujaron puntos de cada colonia en medio AL sólido (8g Nutrient Broth, 4g NaCl, 10g Agar, 1L H₂O dd.) adicionado con aceite de oliva y otro con aceite de maíz, cada aditivo a una concentración de 2.5% peso/volumen. Para mejorar la valoración del halo de degradación se adicionó Rodamina 0.001% peso/volumen al medio AL antes de llenar las cajas Petri. Después de la siembra, las cajas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se observó el crecimiento y degradación a las 12 y 24 horas. A las doce horas se tomó una de las réplicas de cada colonia para observarla en luz UV a 350 nm, a las 24 horas también se observaron bajo la luz UV. La presencia de fluorescencia indicó la actividad lipasa.

En cada caso se midió el halo de degradación en milímetros, midiendo con una regla a partir de la línea de crecimiento de la colonia hacia la línea de degradación. También se

midió el crecimiento de la colonia tomado como el diámetro en milímetros de la colonia en cada medio y en medio LB sólido sin ningún sustrato adicional.

VI.2 Selección por resistencia ambiental a pH y temperatura

Se eligieron aquellas cepas que mostraron los halos de degradación más amplios en los tres ensayos enzimáticos (proteasas, carbohidrasas y lipasas) y se probaron en condiciones de estrés fisiológico, para lo cual se cultivaron muestras de las cepas LM-4, LM-6, LM-7 y WT en medio LB sólido de pH de 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 y 7.5 en cajas Petri para emular las condiciones de acidez que se presentan a lo largo del tracto digestivo del pollo. Para los pH ácidos se tituló con HCl 1M y para el pH neutro y el básico se empleó NaOH 1M. La siembra se realizó tomando una asada de cada cepa y dibujando un punto sobre la superficie de cada medio sólido y se incubaron a 37°C y a 41°C \pm 1°, ya que esta última es la temperatura fisiológica de los pollos adultos. Lo anterior con el fin de simular las condiciones fisiológicas a las que se someterán en el tracto digestivo del hospedero.

Además, para comprobar que a las diferentes condiciones de acidez y basicidad y a la temperatura fisiológica del pollo, las bacterias siguen mostrando sus mismas capacidades enzimáticas ya probadas, es decir, siguen degradando la leche descremada, el almidón y el aceite, se prepararon cajas Petri con LB sólido adicionado con los diferentes sustratos antes probados (leche descremada, almidón, aceite de olivo y de maíz y LB sin sustrato) a los diferentes pH (5.5, 6.0, 6.5, 7.0 y 7.5) y se incubaron a 37°C y a 41°C, con sus respectivas réplicas. Se midió el halo de degradación y crecimiento en cada caso según se describió.

Una vez seleccionada la cepa que mostró la mayor actividad enzimática (halo de degradación) para los diferentes sustratos empleados (Skim Milk, almidón y aceite de olivo o maíz), se estriaron las colonias elegidas en cajas Petri en medio LB sólido durante 12 horas para su activación. Posteriormente se inoculó una asada de la cepa en 30 mL de medio LB líquido y en 30mL de medio Schaefer (8gr Nutrient Broth, 1gr KCl, 0.13gr MgSO₄7H₂O, 1L H₂O_{dd}, pH 7.2, esterilizado a 15 lb., a lo anterior se adicionó una mezcla

de 1mL FeSO₄ 1nM, 1mL NaSO₄ 1M y 1mL MnCl₂ 10mM) en un matraz Erlen Meyer de 250 mL y se incubaron durante 12 horas a 300 rpm con una temperatura de 37° C. Pasado este tiempo se tomaron 3mL del caldo que fueron transferidos a otro matraz de 250mL para ser crecidos durante 2 horas, completando los 30mL con cada medio líquido respectivamente. Se realizó una evaluación de la curva de crecimiento del cultivo midiendo la densidad óptica cada hora tomando lecturas en un espectofotómetro Hach DR 2800 a una longitud de 600 nm.

Además se realizó una tinción Gram tomando una pequeña muestra del cultivo en LB sólido con un asa bacteriológica y diluyéndola en una gota de agua destilada colocada en un portaobjetos, esto tras la flama del mechero para evitar contaminación del cultivo, se dejó secar la muestra y se pasó dos veces de manera rápida por la flama del mechero. A continuación se agregó una gota de cristal violeta y se dejó actuar durante un minuto, se enjuagó con agua destilada colocando el portaobjetos en posición vertical y dirigiendo el chorro del agua de una piseta hacia el extremo superior del portaobjetos de modo que el agua resbalase por la superficie de éste pero sin dirigir el chorro directo sobre la muestra. Posteriormente se aplicó una gota de lugol y se dejó actuar un minuto para enjuagar nuevamente, se agregó una gota de acetona y se enjuagó después de veinte segundos y finalmente se agregó una gota de safranina que se enjuagó pasado un minuto. Una vez seca la muestra se observó al microscopio con el objetivo 100X para comprobar que las cepas seleccionadas se trataran de bacterias Gram positivas lo cuál se evidenció por su coloración morada, y en esta misma muestra se observó la formación de esporas ya que estas se observaron dentro de la célula vegetal con una coloración hialina.

VI.3 Selección de cepas por sus potenciales antimicrobianos

Para este apartado se seleccionaron los principales microorganismos infecciosos reportados en la literatura que forman parte de la microbiota intestinal de pollos y que pueden afectar su desarrollo o desempeño (Zhu *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003; Dumonceaux *et al.*, 2006).

Una vez seleccionadas las cepas de *B. subtilis* que presentaron la mayor capacidad enzimática para los tres tipos de macromoléculas, se probaron sus capacidades antimicrobiales para lo cuál se tomó una muestra de cada cepa seleccionada (de las cepas LM-4, LM-6, LM-7 y WT) y se colocó en medio LB sólido en caja de Petri conteniendo cultivos de bacterias entéricas aisladas a partir de una muestra de heces de pollos diluida en solución salina sumergiendo una asa bacteriológica con la que se estrió una caja de Petri conteniendo medio LB sólido, medio sangre o medio SS. Cada cepa de *B. subtilis* y las aisladas a partir de las heces de pollos se cultivaron durante 24 horas a 41° C para determinar la actividad antagonista considerada como antimicrobiana mediante la observación de una zona de inhibición de crecimiento alrededor del punto de *B. subtilis* en la superficie de cada medio sólido.

Se realizó una selección positiva para aquellas cepas provenientes de las heces de pollo donde se observó una disminución en el crecimiento y mayor proliferación o persistencia de *Bacillus*.

SEGUNDA PARTE.- TRATAMIENTOS Y PARÁMETROS DE RESPUESTA

VI.4 Alimento

Para la elaboración de la dieta básica se tomaron en cuenta los requerimientos mínimos necesarios para una alimentación balanceada para pollos (Armas y Chicco. 1969) desde el primer día de edad, con el fin de elegir los ingredientes de mayor digestibilidad y calidad y adecuados nutricionalmente para cumplir las demandas básicas para que no haya un efecto desfavorable por causa de una mala nutrición que repercuta en la tasa de crecimiento y el estado fisiológico del animal.

La dieta básica empleada para la primera semana de vida de los pollos fue el alimento pre-iniciador Albarrán de SIACOMEX, formado por granos molidos, subproductos de granos, pastas, oleaginosas, harina de pescado, harina de carne y hueso, harina de pollo, harina de cerdo, aceite vegetal, melaza de caña, ortofosfato de calcio, carbonato de calcio, cloruro de sodio; vitaminas (A, D, E, K3, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido pantoténico, ácido fólico); minerales (hierro, magnesio, zinc, yodo, cobre, selenio) y secuestrante de micotoxinas, cuya composición proximal se muestra en la tabla I.

Tabla I.- Composición porcentual en la constitución de la dieta basal sin probiótico.

PROTEINA (MINIMA)	21,00%
GRASA (MÍNIMA)	2,75%
FIBRA (MÁXIMA)	5,00%
HUMEDAD (MÁXIMA)	12,00%
CENIZAS (MÁXIMA)	8,01%
E.L. NITRÓGENO	50,00%

VI.5 Aditivos

Se pesaron y separaron 5kg del alimento y se guardaron en nueve cubetas diferentes previamente etiquetadas de la A a la I. A cada cubeta se le asignó un cucharón para evitar contaminación.

La vacuna seleccionada fue COCCIVAC-B (Laboratorios Schering-Plough Código ATD1-M10) en presentación de 10 x 10000 dosis. Esta vacuna esta compuesta por oquistes vivos de las especies *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mivati* y *E. tenella*. Se seleccionó COCCIVAC como vacuna debido a su contenido, ya que *E. acervulina* es la especie de coccidia más común, mientras que *E. maxima* y *E. mivati* afectan a la ganancia de peso de los pollos y *E. tenella* es la especie de coccidia que causa mayor mortalidad.

El antibiótico empleado fue un ionóforo denominado Lasalocid sódico (ALPHARMA, Nombre comercial Avatec 15%, este es una premezcla anticoccidial que contiene 150gr de lasalocid sódico por cada kilogramo de producto) a razón de 500g por tonelada de alimento. El lasalocid sódico es un anticoccidial polieter ionóforo divalente de amplio espectro recomendado para prevención de coccidiosis en pollos de engorda, ideal para mezclar con alimentos de crecimiento y finalización. El lasalocid sódico actúa en las etapas tempranas del ciclo de reproducción de las coccidias y mejora la conversión alimenticia y el consumo de alimento.

Finalmente, se mezcló el probiótico, conteniendo la cepa bacteriana seleccionada que para el caso fue LM-4 (Laboratorio de Microbiología Molecular de CICESE), a razón de 1kg/tonelada de alimento.

VI.6 Tratamientos

Los tratamientos se llevaron a cabo en Jiutepec, Morelos con la colaboración y asesoría del Biólogo Lauro Trejo (del departamento de Departamento de Hemoparásitos y

Helmintología del Centro Nacional de Parasitología CENAPA, Jiutepec, Morelos y del Servicio de Asesoría y Consultoría en Parasitología) y el apoyo técnico de Maryangela Trejo M.

Se emplearon 270 pollos de un día de nacidos, vacunados al nacer contra Newcastle y Marek, los cuáles fueron pesados y se valoró su estado de salud general para posteriormente dividirlos en nueve grupos de 30 individuos cada uno. Cada grupo fue destinado a cada uno de los siete tratamientos (B a H) y a los controles A, al cuál se le brindó el alimento comercial sin aditivo (vacuna, antibiótico ni probiótico), es decir, no tratado, y que no fue expuesto a la infección por coccidiosis (no desafiado), e I al cuál se le brindó el alimento comercial sin aditivo, es decir sin vacuna, antibiótico ni probiótico (no tratado), pero que sí fue expuesto a la infección por coccidiosis (desafiado). Los corrales se distribuyeron de modo que de un lado quedaran los tratamientos que no serían vacunados, de otro los vacunados, y aparte los controles, para minimizar la posibilidad de contaminación.

Todos los grupos fueron criados en corrales previamente desinfectados de 1.5 metros por lado a una densidad aproximada de 13 pollos/m². Se colocaron en camas de cascarilla de arroz. Se midieron la temperatura ambiente, la temperatura mínima y máxima y los niveles de humedad y de humedad mínima y máxima.

A la entrada de los corrales se colocó una cubeta con paja empapada de desinfectante con el fin de evitar la contaminación al entrar.

Los pollos se mantuvieron con calefacción artificial a temperatura de 28 a 30°C durante la primera semana, a 24-26°C durante la segunda semana y en un rango de temperatura de 20 a 26°C a partir de la tercera semana en adelante. Se colocó luz artificial de tres fuentes durante la tarde para que se mantuvieran iluminados y comieran durante la mayor parte del día, y se dejó solo una luz durante la madrugada, de modo que estuvieran en penumbra para que durmieran lo necesario.

Se les proporcionó 5kg del alimento correspondiente para que tuvieran alimento disponible las 24 horas en comedero de iniciación durante las dos primeras semanas,

posteriormente se cambió a comedero de bote. A medida que iban consumiendo el alimento se evaluó si requerían que se les añadiera más según la demanda de los pollos en cada corral. Al final de la semana se retiró el alimento rechazado para pesarlo y se rellenó el comedero. Se proporcionó agua pura *ad libitum* en bebederos de iniciación durante las dos primeras semanas y después en bebederos de campana.

Se manejaron dos grupos control, el blanco, denominado A, al que se le proporcionó el alimento base pero sin probiótico ni antibiótico, y que además no fue vacunado ni desafiado (no se infectó con coccidia). El grupo I, destinado como control negativo ya que a éste se le proporcionó el alimento base sin probiótico ni antibiótico, no fue vacunado pero si fue desafiado (se infectó con coccidia).

El resto de los grupos fueron alimentados con la dieta basal y el tratamiento correspondiente según se indica en la tabla II.

Tabla II.- Tratamientos para la alimentación de los pollos, todos parten de la dieta basal.

Grupo	Probiótico	Vacuna	Antibiótico	Desafío
A	NO	NO	NO	NO
B	NO	SI	NO	SI
C	NO	NO	SI	SI
D	NO	SI	SI	SI
E	SI	NO	NO	SI
F	SI	SI	NO	SI
G	SI	NO	SI	SI
H	SI	SI	SI	SI
I	NO	NO	NO	SI

Para el tratamiento A, I y B, se separó el alimento en botes previamente etiquetados con un cucharón exclusivo para cada bote. Para los grupos C y D, se pesaron 2.5g de antibiótico c/u y se premezclaron con una porción del alimento. Ya homogeneizada perfectamente la premezcla se adicionó al resto del alimento y se homogeneizó nuevamente. Se pesaron 5g del probiótico potencial (que contiene la cepa LM-4), se premezcló con parte del alimento y se incorporó al resto del alimento para homogeneizar y así preparar los alimentos para los grupos E y F. Finalmente, se pesaron 5g del probiótico potencial (que contiene la cepa LM-4) mas 2.5g de antibiótico y se siguió el mismo procedimiento para preparar los alimentos para G y H.

Para preparar la vacuna se tomaron 1.5mL de COCCIVAC y se aforaron a 75mL con agua potable. Con una pipeta Pasteur se tomó 0.5mL y se suministró vía oral a cada uno de los pollos de los grupos B, D, F y H.

Los grupos fueron alimentados con la dieta correspondiente hasta el día 42, a partir del día 22 fueron desafiados (infectados con coccidia).

VI.7 Parámetros Productivos de Respuesta a los Tratamientos

Se midieron los principales parámetros productivos, fisiológicos y de potencial anticoccidial los días 1, 7, 14, 21, 28 y 42.

Semanalmente se midió crecimiento (ganancia porcentual de peso), conversión de alimento y supervivencia.

VI.7.A) Ganancia porcentual de peso.- El día de recepción de los pollos (día uno) y cada semana (días 7, 14, 21, 28 y 42) se seleccionaron de manera aleatoria 15 individuos para cada corral, los cuáles fueron pesados en sus respectivos corrales empleando una balanza granataria. Se calculó la ganancia de peso (G.P.) obteniendo la diferencia entre el peso semanal y el medido una semana antes. También se realizó el cálculo de la ganancia de peso diario dividiendo la G.P. entre los siete días.

VI.7.B) Conversión de alimento.- Se llevó un registro de la cantidad de alimento consumido por diferencia entre el alimento ofrecido y el rechazado al final de cada semana, para obtener un estimado semanal de alimento consumido mediante dicha diferencia entre el número de pollos, se dividió la cantidad de alimento consumido por pollo entre la ganancia de peso por pollo.

VI.7.C) Supervivencia.- Se cuantificaron diariamente los decesos observados al final del día.

VI.8 Parámetros Fisiológicos de Respuesta a los Tratamientos

Los días 1, 14, 28 y 42 se seleccionaron dos individuos aleatoriamente de cada corral, se trasladaron en ayuno al laboratorio para su sacrificio por dislocación cervical.

De cada pollo se tomó una muestra sanguínea por punción cardíaca que se colocó en tubos previamente etiquetados, se sellaron y se centrifugaron inmediatamente a 2800 rpm durante 15 minutos para posteriormente almacenarlas a -4° C. Con estas muestras se determinaron las concentraciones plasmáticas de glucosa, creatinina, colesterol, triglicéridos, bilirubina total y directa, calcio, LDH, AST, proteínas totales, albúmina plasmática y globulinas por espectrofotometría (Miranda-López *et al.*, 2007), empleando un equipo de química clínica Atac 8000 (ELAN Diagnostics, USA), que es un analizador automatizado para la realización de pruebas bioquímicas con capacidad para 40 reactivos individuales, con ayuda de la Q.F.B. Lidia Martínez del Laboratorio de Diagnóstico Clínico Molecular, Ensenada, Baja California.

Se colocó cada individuo en una charola de disección previamente esterilizada y se realizó disección abdominal con bisturí para la observación de la condición intestinal del animal observada a simple vista, para lo cuál se tomaron fotografías de cada segmento intestinal (duodeno, yeyuno, ileon y ciegos) e hígado para su posterior valoración

macroscópica. Se realizaron cortes de cinco centímetros en cada sección y en cada uno se midió pH intestinal empleando tiras de pH.

VI.9 Parámetros de potencial anticoccidial

Se buscó la presencia o el daño ocasionado por parásitos del género *Eimeria* en los pollos sacrificados por dislocación cervical después del desafío por cada tratamiento para determinar la persistencia del patógeno en pollos sanos (que no muestren ningún síntoma clínico) así como el grado de daño ocasionado por *Eimeria sp* en el tracto intestinal de pollos enfermos mediante valoración visual directa del intestino extendido en una charoal de disección, marcando con 0 a los intestinos sin daño aparente (normales), + para aquellos que muestren daño leve, ++ para daño moderado, +++ daño severo y finalmente ++++ para daño muy severo y cuantificación de ooquistes en comparación con los sanos.

VI.9.A) Cuantificación de ooquistes.- Para la cuantificación de ooquistes se tomaron cinco muestras aleatorias de heces de cada corral. Para tomar las muestras se utilizaron botas de seguridad diferentes para cada corral con el fin de evitar la contaminación y se buscaron heces frescas. Se emplearon 2g de heces de cada corral de manera semanal y se diluyeron en 28mL de solución sobresaturada de cloruro de sodio (1.18 a 1.20g/mL). Se homogenizó la muestra y posteriormente se tamizó y se tomó una alícuota con una pipeta para llenar una cámara de conteo McCaster, en la cuál se dejó reposar durante cinco minutos para después observarla al microscopio con el aumento de 10X. Se contabilizó el número de ooquistes observados en la muestra (multiplicado por el factor de corrección).

VI.9.B) Cálculo del índice anticoccidial

El cálculo del índice anticoccidial (IAC) integra los parámetros considerados como productivos de supervivencia y ganancia relativa de peso y parámetros de potencial anticoccidial que son el índice de lesiones e índice de ooquistes, con el fin de integrar un índice que refleje el efecto del tratamiento sobre el crecimiento del pollo así como el grado de protección contra la coccidia. El índice anticoccidial se calcula mediante la siguiente fórmula tomada de Tamasaukas *et al.* (1996):

$$\text{IAC} = (\% \text{ Supervivencia} + \% \text{ ganancia relativa de peso}) - (\text{Índice de lesiones} + \text{Índice de ooquistes}) \quad (1)$$

Donde:

$$\% \text{ Supervivencia} = \# \text{ pollos sobrevivientes} / \# \text{ pollos iniciales} * 100$$

$$\% \text{ Ganancia relativa de peso} = \text{Ganancia de peso del grupo} / \text{Ganancia de peso del control A}) * 100$$

$$\text{Índice de ooquistes} = \text{Ooquistes en el grupo} * 0.4 / \text{Ooquistes del control I}$$

$$\text{Índice de lesiones} = \text{Total de lesiones en el grupo} * 10 / \# \text{ de pollos}$$

VI.10 Desafío

El día 22 se administró una dosis de 10^5 ooquistes esporulados de *Eimeria sp.* de manera homogénea a todos los tratamientos excepto al grupo A, el cual permaneció como grupo control. Los ooquistes empleados para el desafío fueron proporcionados por el Biólogo Lauro Trejo (Servicio de Asesoría y Consultoría en Parasitología) aislados de pollos de engorda infectados y esporulados en Abril del 2008, conservados en solución de dicromato de potasio 2.5%, con un porcentaje de viabilidad del 80 al 98% y 98% de pureza y reactivados en Octubre del 2008 para su empleo para este proyecto. En la tabla III se

muestra el número de ooquistes por especie que se mezcló para formar el cóctel de ooquistes para el desafío. La mezcla de ooquistes esporulados se adicionó en una porción de alimento de un día (calculada según el consumo semanal observado), se homogeneizó y sirvió en un comedero de canaleta. Una hora antes de ofrecer la mezcla de alimento con ooquistes se retiró el alimento a los pollos para asegurar que consumieran todo el alimento de la canaleta.

Tabla III.- Cantidad de ooquistes por especie correspondientes a una dosis por ave.

Especie	Dosis
<i>E. acervulina</i>	200000
<i>E. maxima</i>	50000
<i>E. praecox</i>	200000
<i>E. tenella</i>	25000
TOTAL	475000

VI.11 Sistema Biovector de Entrega

Con el fin de incrementar la respuesta inmunoestimuladora producida por el probiótico, se pretendió conformar un sistema biovector acarreador de una proteína antigénica de la coccidia fusionada a una proteína de cubierta de la bacteria con el objetivo de que además de las capacidades probióticas probadas (producción de enzimas tipo proteasas, carbohidrasas y lipasas; resistencia a acidez y temperatura; actividad antimicrobiana, mejora del estado de salud de pollos de engorda y disminución de lesiones intestinales) durante los tratamientos se pueda generar un precedente para el mejoramiento

genético de la cepa probiótica de modo que se puedan potenciar sus capacidades incrementando el beneficio obtenido para los pollos.

VI.12 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de los fragmentos sobrelapantes correspondientes a las proteínas de cubierta *cotB* y *cotC* de *B. subtilis* en base a las secuencias genéticas encontradas en BSORF² y para las proteínas antigénicas TA4 y NA4 de *Eimeria* en base a las secuencias obtenidas del NCBI³.

Para las regiones codificadoras de las proteínas de cubierta de la espora se diseñaron los oligonucleótidos Sentido de modo que abarcaran la región promotora y los sitios de unión para la proteína reguladora GerE (-73.5 y -47.5 para *CotB* y -68.5 para *CotC*). En su extremo 5' se incluyó un sitio de corte para la enzima BamHI.

Para el diseño de los oligonucleótidos Antisentido para *cotB* y *cotC* se tomaron en cuenta los primeros 280 aminoácidos (aa) para *cotB* y los primeros 110 aa para *cotC*. En el extremo 5' de cada oligonucleótido se incluyeron los primeros 21 nucleótidos complementarios a la región codificadora para cada uno de las proteínas antigénicas, es decir, tanto para NA4 como para TA4 para cada proteína de cubierta.

Con el fin de amplificar las proteínas antigénicas se cambió el codón de terminación de TA4 y NA4 por el que emplea *B. subtilis* que es el codón TAA. En el extremo 5' se pusieron los primeros 21 nucleótidos complementarios al extremo 3' terminal de *cotB* y *cotC* seguidos de las primeras bases de cada antígeno, de modo que cuando se realice la fusión en fase, esta parte se complemente con la cola de bases antigénicas añadidas en el extremo 3' de las proteínas de cubierta. Con esto se forman los oligonucleótidos Sentido para los antígenos TA4 y NA4.

² <http://bacillus.genome.jp/>

³ National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Con el fin de obtener un producto con sitios de restricción específicos, en el extremo 5' de los oligonucleótidos Antisentido para TA4 y NA4 se consideró el mensajero completo y se incluyó un sitio de corte para la enzima EcoRV.

Los oligonucleótidos finales y sus sitios de hibridación se muestran en la tabla IV.

Tabla IV.- Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las secuencias codificadoras para las proteínas de cubierta y las secuencias antigénicas*.

Nombre	Secuencia 5' - 3'	No. Bases	% GC	Componentes	Sitio de Hibridación	Productos de amplificación de 5' a 3'	Tamaño del Producto
BBHI	<u>GCGGATCCGGCGATGTATGAACGGATTAGG</u>	5'	29	50	BamHI-CotB	-275 a -254	
BNA4	aacaaaagagagacgagccatCGAACGACCAGATTTGGATGATT	3'	44	43	Compl NA4- Compl CotB	818 a 840	BamHI-CotB-1ras21bsNA4
BTA4	gtaactgctgttggtatccCGAACGACCAGATTTGGATGATT	3'	44	43	Compl TA4- Compl CotB	818 a 840	BamHI-CotB-1ras21bsTA4
CBHI	<u>GCGGATCCGCCGTGCAGCAGGAAAA</u>	5'	25	59	BamHI-CotC	-125 a -109	
CNA4	aacaaaagagagacgagccatCTCTACAACATAATCATAGTCTTTTTATCGTGA	3'	55	29	Compl NA4- Compl CotC	297 a 330	BamHI-CotC-1ras21bsNA4
CTA4	gtaactgctgttggtatccCTCTACAACATAATCATAGTCTTTTTATCGTGA	3'	55	29	Compl TA4- Compl CotC	297 a 330	BamHI-CotC-1ras21bsTA4
NA4ERV	<u>GATATCTTAGAAGAGAGCGAAAGCGGA</u>	3'	27	48	EcoRV-Compl NA4	727 a 744	
NA4B	tcatccaaatcgtctcgATGGCTCGTCTCTCTTTGTTC	5'	44	43	CotB-NA4	+1 a +23	1ras21bsCotB-NA4-EcoRV
NA4C	gactatgattgttagagATGGCTCGTCTCTCTTTGTTC	5'	44	43	CotC-NA4	+1 a +23	1ras21bsCotC-NA4-EcoRV
TA4ERV	<u>GATATCTTAGAAGGACAAGAAATTATCAACCAAGTT</u>	3'	36	30	EcoRV-Compl TA4	1222a 1245	
TA4B	tcatccaaatcgtctcgGGATTACCCAACAGCAGTTACG	5'	43	50	CotB-TA4	+8 a +29	1ras21bsCotB-TA4-EcoRV
TA4C	gactatgattgttagagGGATTACCCAACAGCAGTTACG	5'	43	50	CotC-TA4	+8 a +29	1ras21bsCotC-TA4-EcoRV

*Las letras subrayadas indican el lugar de corte para las enzimas de restricción, las letras minúsculas indican las regiones sobrelapantes y las letras en negritas indican el codón de terminación añadido correspondiente al empleado por *Bacillus*.

Los oligonucleótidos diseñados fueron pedidos a INVITROGEN, el stock de trabajo se preparó a una concentración de 200ng/μL, es decir, con un factor de dilución 1:10.

VI.13 Extracción de DNA cromosomal

Se extrajo el DNA de *B. subtilis* con el fin de amplificar las secuencias codificadoras de las proteínas de cubierta *cotB* y *cotC* para la elaboración del sistema biovector de entrega. Se trabajó con las cepas de *Bacillus* BB80 y LM-4 provenientes del Laboratorio de Microbiología Molecular del CICESE a cargo del Dr. Jorge Olmos.

Para la extracción del DNA cromosomal de *B. subtilis* se inocularon 3mL de medio líquido LB y se colocó en un orbitador marca Lab-Line a 37° C y 250 rpm durante una noche. A la mañana siguiente se tomaron 1.5mL del cultivo y se colocaron en un tubo ependorf para posteriormente centrifugar a 12000 rpm en una centrifuga 5415 C durante tres minutos. Se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 567 µL de buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM y H₂Odd, se esterilizó a 15Lb y se filtró a 2µ), se dio vortex en un modelo M63215 marca Thermolyne. Se agregaron 5µL de lisozima y se incubó durante diez minutos en un baño de agua a 37° C, pasado este tiempo se adicionaron 10µL de RNAsa y se incubó veinte minutos más procurando siempre cubrir la tapa del tubo con parafilm. Se adicionaron 30µL de SDS al 10% y 3µL de proteinasa K, se mezcló e incubó por un lapso de una hora en el baño de agua usado previamente dando ligeros golpes al tubo cada quince minutos.

Se adicionaron 100µL de NaCl 5M con el objeto de evitar la formación de un complejo ácido nucleico-CTAB y poder así mantener el DNA soluble.

Se agregaron 80µL de CTAB/NaCl (CTAB al 10%, NaCl 0.7M, H₂Odd). Se tapó bien el tubo con parafilm y tapa de seguridad y se sometió a un baño de agua en un termoblock de Thermolyne a 65° C durante diez minutos.

Tras la incubación a 65° C se añadieron 700µL de cloroformo/alcohol isoamílico (en proporción 24:1), se agitó y centrifugó por cinco minutos para después transferir el sobrenadante acuoso-viscoso a un tubo ependorf nuevo de 1.5mL, sin tocar la interfase blanca formada (si dicha interfase era muy gruesa se agregó nuevamente cloroformo/alcohol isoamílico y se centrifugó por cinco minutos más). Se agregó un

volumen igual al sobrenadante obtenido de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (en proporción 25:24:1), se agitó y centrifugó cinco minutos. El sobrenadante (aproximadamente se obtienen 600 μ L) fue transferido a un tubo nuevo de la misma capacidad y se agregaron 360 μ L (0.6 volúmenes) de isopropanol con el fin de precipitar los ácidos nucleicos, se agitó y centrifugó por diez minutos. El sobrenadante fue cuidadosamente decantado pegando el tubo a la pared de un vaso de precipitados.

Se lavó agregando 1mL de etanol al 70%, se centrifugó cinco minutos y se decantó. Se repitió el paso anterior para dar un mejor lavado y se dejó secar el pellet colocando el tubo destapado boca abajo sobre papel absorbente.

Una vez seco se disolvió el pellet en 100 μ L de buffer TE y se verificó en gel de agarosa al 1.2% usando 5 μ L, el resto se guardó a -20° C hasta su uso.

Para la extracción del DNA cromosomal correspondiente a *Eimeria*, se tomó una muestra de 100 μ L de ooquistes correspondiente a *E. tenella* o *E. acervulina* a una concentración de 8 millones de ooquistes/mL en un tubo ependorf nuevo de 1.5mL, se agregó un volumen igual de HCl 1M y se incubó una hora a 55°. Se agregaron 100 μ L de NaOH 1M y se incubó una hora a 65°. Se centrifugó a 4000 rpm y se decantó. Se lavó con PBS y se centrifugó. Se realizaron cuatro lavados más con H₂O_{dd} esterilizada y filtrada a 2 μ . Este procedimiento hizo susceptibles a los ooquistes para su degradación, para lo cuál se adicionaron 100 μ L de DNazol. Sin embargo, la gran cantidad de DNAsas presentes no permitieron obtener el DNA deseado.

VI.14 Amplificación de *cotC*, *cotB*

Con el DNA cromosomal extraído de *B. subtilis* se llevó a cabo una Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR, empleando los oligos diseñados con el fin de amplificar las secuencias codificadoras de las proteínas de cubierta y antigénicas empleando la combinación de oligos mostrada en la tabla V.

Los reactivos empleados para cada reacción se muestran en la tabla VI, y el protocolo de amplificación que se llevó a cabo en un termociclador marca Bio-RAD iCicler, se muestra en la tabla VII, donde se señala con fondo gris el paso de temperatura variable la cual depende de la temperatura de hibridación correspondiente a cada oligo según su longitud, mientras que el resto de los pasos son fijos ya que la desnaturalización y la polimerización se da a una temperatura constante.

Para la amplificación de las proteínas de cubierta se emplearon las siguientes combinaciones de oligos: para amplificar el segmento de *cotB* sobrelapante con *NA4* se empleó el oligo BBHI (sentido) que hibrida en el extremo 5' y BNA4 (antisentido) que hibrida en el extremo 3' de *cotB*; para amplificar el segmento de *cotB* sobrelapante con *TA4* se empleó el oligo BBHI (sentido) que hibrida en el extremo 5' y BTA4 (antisentido) que hibrida en el extremo 3' de *cotB*; para amplificar el segmento de *cotC* sobrelapante con *NA4* se empleó el oligo CBHI (sentido) que hibrida en el extremo 5' y CNA4 (antisentido) que hibrida en el extremo 3' de *cotC*; finalmente, para amplificar el segmento de *cotC* sobrelapante con *TA4* se empleó el oligo CBHI (sentido) que hibrida en el extremo 5' y CTA4 (antisentido) que hibrida en el extremo 3' de *cotC*.

Tabla V.- Combinación de oligos correspondientes a las posiciones 5' y 3' que se emplearon para cada reacción de PCR con el DNA correspondiente. Las primeras cuatro combinaciones se emplearon para la amplificación de las proteínas de cubierta de *B. subtilis* y las combinaciones 5 a 8 para las proteínas antigénicas de coccidia. En la última columna se muestra el tamaño esperado de los fragmentos.

Combinación	5'	3'	Longitud
1	BBHI	BNA4	1144
2	BBHI	BTA4	1144
3	CBHI	CNA4	484
4	CBHI	CTA4	484
5	NA4B	NA4ERV	774
6	NA4C	NA4ERV	774
7	TA4B	TA4ERV	1167
8	TA4C	TA4ERV	1167

Tabla VI.- Reactivos por cada reacción de PCR.

Reactivo	Volumen
H ₂ O	37.5 µL
Buffer 10x	5.0 µl
MgCl ₂	1.5 µL
dNTP's	1.0 µL
Oligo 5'	1.0 µL
Oligo 3'	1.0 µL
DNA molde	2.0 µL
Taq polimerasa	1.0 µL
Volumen Final	50.0 µL

Tabla VII.- Protocolo de amplificación.

Ciclos	Pasos	Temperatura	Tiempo
1x	1	95°	5 min
25x	1	95°	1 min
	2	55°	1 min
	3	72°	2 min
1x	1	72°	10 min
1x	1	4°	∞

El recuadro sombreado indica el paso de temperatura variable.

VII. RESULTADOS

PRIMERA PARTE.- SELECCIÓN DE CEPAS DE *B. subtilis*

Del total de cepas de *B. subtilis* del cepario del laboratorio de Microbiología Molecular a cargo del Dr. Jorge Olmos, se seleccionaron tres, denominadas LM-4, LM-6 y LM-7, y una cepa silvestre obtenida de un cultivo con arroz facilitada por la Lic. Cecilia Soto del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma de Baja California, denominada WT, a las cuales se les aplicaron las pruebas de selección para elegir una sola para ser aplicada en los tratamientos de los pollos.

VII.1 Selección de cepas por sus potenciales enzimáticos.

Antes de los bioensayos de degradación enzimática, se sembraron las cepas seleccionadas en medio LB sólido y se incubaron a 37°C para medir su crecimiento. Las cepas LM-6 y WT mostraron un crecimiento muy similar, de tan sólo 5mm de diámetro colonial a las 12 horas de cultivo, llegando a 8mm a las 24 horas. LM-7 alcanzó el mayor diámetro colonial en dichas condiciones, con un diámetro de 11mm a las 12 horas llegando hasta 63mm a las 24 horas de crecimiento. LM-4 mostró un crecimiento intermedio a las anteriores con 11mm a las 12 horas y 25mm a las 24 horas. Es decir que LM-4 y LM-7 presentan el mismo crecimiento a las doce horas, pero LM-7 tiene un mayor crecimiento posterior. Con el crecimiento anterior se partió para comparar el crecimiento estándar (medio LB sólido a 37 °C) con el obtenido con cada sustrato a las mismas condiciones de temperatura y tiempo.

Para comprobar la presencia de la actividad enzimática deseada, se obtuvieron los siguientes resultados en cada sustrato correspondiente.

VII.1.A) *Proteasas*. Las cepas sembradas en medio LB sólido adicionado con leche descremada mostraron la misma tendencia que en las condiciones estándar ya que las cepas de menor crecimiento fueron LM-6 y WT (5mm a las 12 horas y 8mm a las 24 horas), seguidas por LM-4 (8mm, 12 horas y 13mm, 24 horas), y LM-7 mostró nuevamente el mayor crecimiento (17mm 12 horas, 55mm 24 horas).

A las 12 horas tanto LM-4 como LM-7 presentaron un halo de degradación de 1mm, el cuál no se incrementó con el tiempo. En cambio, LM-6 y WT, presentaron un halo inicial de 2mm llegando hasta 4mm a las 24 horas.

VII.1.B) *Carbohidrasas*. Se valoró la degradación en medio enriquecido con almidón lo que denotó actividad tipo amilasa. El crecimiento en este medio a las doce horas fue de 7mm para LM-6, 6mm para LM-4 y 19mm para LM-7 y a las 24 horas fue de 10mm LM-6, 30mm LM-4 y 29mm LM-7.

LM-7 a pesar de mostrar un buen crecimiento no evidenció ningún halo de degradación con los vapores de yodo. En cambio, a pesar de mostrar el menor crecimiento, LM-6 y WT mostraron el mayor halo de degradación de 2.5mm (12 horas) a 4.5mm (24 horas). En cuanto a LM-4, no se observó halo a las doce horas, sino que se visualizó hasta las 24 horas midiendo 2.5mm.

VII.1.C) *Lipasas*. El crecimiento en este medio llevó el mismo patrón que en los anteriores, siendo LM-6 y WT los de menor crecimiento (mm 12 horas, mm 24 horas), seguidos por LM-4 (mm 12 horas, mm 24 horas), y mostrando el mayor crecimiento LM-7 (mm 12 horas, mm 24 horas). No se observó halo de degradación sino que se buscó fluorescencia de la rodamina bajo la lámpara UV, mostrándose en la línea de crecimiento para los tres casos y algunos puntos dispersos en el área de crecimiento de LM-4.

VII.2 Selección por resistencia ambiental a pH y temperatura.

En las pruebas con los diferentes pH en medio LB sólido, las cepas LM-4 y LM-7 mostraron el mayor crecimiento a los pH de 5.5, 6.0 y 6.5 tanto a 37° como a 41° C, mientras que WT y LM-6 mostraron el mismo escaso crecimiento en todos los pH en ambas temperaturas que en las condiciones estándar.

Para comprobar que las cepas mantuvieran sus diferentes capacidades enzimáticas a las condiciones fisiológicas del pollo, se repitieron los bioensayos enzimáticos a los diferentes pH y a 41 °C de temperatura.

En todos los casos LM-6 y WT mostraron el mismo crecimiento que en las condiciones estándar, sin embargo mostraron un halo de degradación de hasta 4mm para proteasas y hasta 4.5mm para carbohidrasas a los pH de 6.0 y 6.5, no hubo gran diferencia entre las temperaturas probadas (37 °C y 41 °C) (Tabla VIII).

Tanto para LM-4 como para LM-7 se mantuvo la actividad enzimática a los diferentes pH a 41 °C, mostrándose el mayor crecimiento a los pH de 5.5, 6.0 y 6.5.

Tabla VIII.- Resumen de los resultados obtenidos en los bioensayos enzimáticos.

Factor	CEPA			
	LM-4	LM-6	LM-7	WT
pH de mayor crecimiento	5.5, 6.0 y 7.5	6.5 y 7.5	5.5 y 7.5	6.5 y 7.5
Temperatura de mayor crecimiento	41°	37°	37°	37°
Crecimiento Promedio 37° (mm)	32.6	8.2	42.5	8.0
Crecimiento Promedio 41° (mm)	45.7	6.9	39.4	7.0
Halo Degradación Skim Milk (mm)	2.0	3.5	1.0	3.5
Halo Degradación Almidón (mm)	2.5	4.0	0.0	4.0

Después de las pruebas de degradación de sustratos y tomando en cuenta el crecimiento a las diferentes temperaturas y a los distintos valores de pH, se seleccionó la cepa LM-4, ya que, a pesar de que LM-6 tuvo las mayores capacidades de actividad tipo amilasas y carbohidrasas, presentó un crecimiento muy pobre; LM-7 mostró el mayor crecimiento, pero sólo mostró grandes capacidades lipasas, poco en proteasas y nulas en carbohidrasas; finalmente, LM-4 mostró un buen crecimiento en todas las condiciones probadas y capacidades enzimáticas para los tres tipos probados además de que mostró mayor crecimiento a los 41° C lo cuál resulta idóneo ya que es la temperatura fisiológica a la que se encontrará en el interior del pollo.

Curva de crecimiento

Una vez seleccionada la cepa denominada LM-4, se caracterizó su curva de crecimiento con el objetivo de establecer sus fases de crecimiento ya que se necesita establecer el tiempo en que entra a la fase estacionaria para llevar el cultivo a las concentraciones deseadas para formular el alimento, encontrándose el inicio de la fase estacionaria (T_0) a las cinco horas de crecimiento (Fig.7).

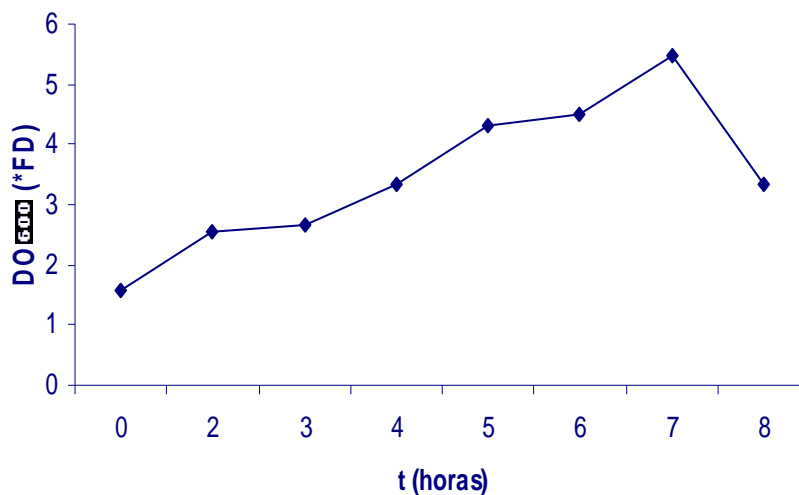


Figura 7.- Curva de crecimiento de la cepa LM-4 en el medio de esporulación Schaeffer a 300 rpm con una temperatura de 37° C.

La tinción Gram mostró que la cepa LM-4 corresponde a un bacilo gram positivo debido a que mostró una coloración violeta, además de observarse esporas, las cuáles se observan hialinas en la tinción dentro de las células vegetativas.

VII.3 Selección de cepas por sus potenciales antimicrobiales

A partir de las heces de pollo disueltas en solución salina, se aislaron colonias bacterianas en medio LB, sangre y SS. Las cepas aisladas fueron sometidas a una tinción Gram, con lo que se obtuvieron dos grupos: las Gram (+) y Gram (-).

Las bacterias Gram (+) fueron identificadas por su forma y características coloniales como pertenecientes al grupo *Bacillus sp.* y *Lactobacillus sp.* En este grupo se aislaron cuatro diferentes cepas.

Las bacterias Gram (-) se identificaron como pertenecientes al grupo de las proteobacterias, del grupo gamma, en el orden de las enterobacteriales, todas con forma de bacilo. Se aislaron tres diferentes cepas de este grupo.

Todas las cepas aisladas fueron sembradas a manera de punto junto a un punto previamente sembrado de la cepa LM-4 correspondiente a *B. subtilis*. Las bacterias Gram (+) crecieron ampliamente sin verse limitadas por la presencia de LM-4, pero sin afectar el crecimiento de ésta última. En cambio, las cepas Gram (-) se vieron muy limitadas en su crecimiento, predominando el crecimiento de la cepa LM-4.

SEGUNDA PARTE.- PARÁMETROS DE RESPUESTA A LOS TRATAMIENTOS

VII.4 Parámetros Productivos de Respuesta a los Tratamientos

VII.4.A) *Ganancia porcentual de peso*

El peso promedio de cada pollo fue tomado de los treinta pollos por tratamiento a partir del primer día de nacido. En promedio el peso inicial de los pollos fue de 50.8 (Tabla IX). En la tabla X se muestra el progreso en el crecimiento de los pollos en ganancia en peso y ganancia en peso diario durante las seis semanas de tratamiento. Antes del desafío se observó un mayor ganancia diaria de peso y por tanto, un mayor peso promedio, para los tratamientos E y H y, aunque las semanas subsiguientes este comportamiento varió un poco, en la gráfica (Fig.8) se puede observar que al final del tratamiento las curvas que representan los tratamientos a los cuáles se les proporcionó el probiótico (E, F, G y H), se encuentran por encima de las curvas de los tratamientos sin probiótico (B, C y D) y los controles (A e I), obteniendo el mayor rendimiento promedio en F, seguida por H, E y G.

Tabla IX.- Peso promedio por pollo correspondiente a cada tratamiento. D= día.

Tratamiento	D 1	D 7	D 14	D 21	D 28	D 35	D 42
A (NTND)	51.80	125.00	293.33	630.00	996.00	1460.00	1831.00
B (VD)	50.83	131.67	326.67	578.33	904.00	1349.00	1843.00
C (AD)	51.67	138.33	330.00	619.17	1020.00	1391.00	1870.00
D (VAD)	53.33	123.33	305.33	610.83	830.00	1313.00	1778.00
E (PD)	51.83	151.67	350.00	639.17	1118.00	1402.00	1947.00
F (PVD)	50.00	118.33	346.67	632.50	1070.00	1595.00	2138.00
G (PAD)	53.33	130.00	313.33	581.67	1072.00	1653.00	1941.00
H (PVAD)	51.66	136.67	366.00	645.83	1110.00	1576.00	2052.00
I (NTD)	51.80	121.67	282.00	608.33	982.00	1209.00	1751.00

* NT= No tratado; ND= No desafiado (no infectado con coccidia); D= Desafiado (infectado con coccidia); V= Vacunado; A= Suplementado con antibiótico; P= Suplementado con probiótico.

Tabla X.- Ganancia de peso G.P. semanal (S 1 a 6) y ganancia de peso diario G.P.D. calculada a partir del peso semanal de los pollos de cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	S 1		S 2		S 3		S 4		S 5		S 6	
	G.P.	G.P.D	G.P.	G.P.D	G.P.	G.P.D	G.P.	G.P.D	G.P.	G.P.D	G.P.	G.P.D
A (NTND)	73.20	10.46	168.33	24.05	336.67	48.10	366.00	52.29	464.00	66.29	371.00	53.00
B (VD)	80.84	11.55	195.00	27.86	251.67	35.95	325.67	46.52	445.00	63.57	494.00	70.57
C (AD)	86.66	12.38	191.67	27.38	289.17	41.31	400.83	57.26	371.00	53.00	479.00	68.43
D (VAD)	70.00	10.00	182.00	26.00	305.50	43.64	219.17	31.31	483.00	69.00	465.00	66.43
E (PD)	99.84	14.26	198.33	28.33	289.17	41.31	478.83	68.40	284.00	40.57	545.00	77.86
F (PVD)	68.33	9.76	228.34	32.62	285.83	40.83	437.50	62.50	525.00	75.00	543.00	77.57
G (PAD)	76.67	10.95	183.33	26.19	268.33	38.33	490.33	70.05	581.00	83.00	288.00	41.14
H (PVAD)	85.01	12.14	229.33	32.76	279.83	39.98	464.17	66.31	466.00	66.57	476.00	68.00
I (NTD)	69.87	9.98	160.33	22.90	326.33	46.62	373.67	53.38	227.00	32.43	542.00	77.43

* NT= No tratado; ND= No desafiado (no infectado con coccidia); D= Desafiado (infectado con coccidia); V= Vacunado; A= Suplementado con antibiótico; P= Suplementado con probiótico.

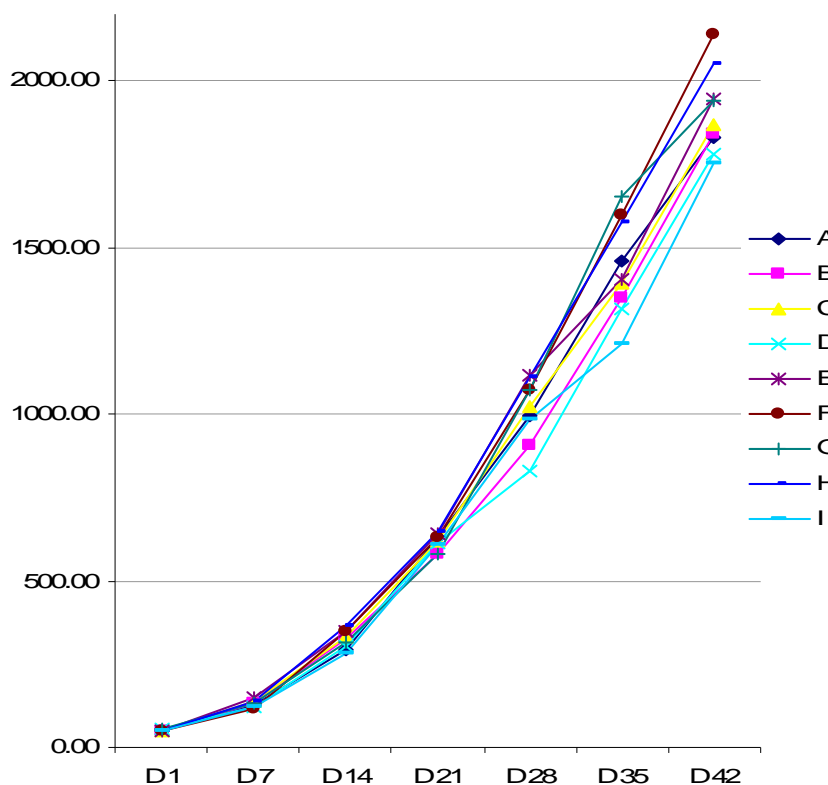


Figura 8.- Peso promedio correspondiente a los pollos de cada tratamiento calculado semanalmente.

En la figura 9 se puede apreciar mejor la diferencia que hubo en el peso promedio final entre los tratamientos, observándose el menor peso final alcanzado por el grupo I correspondiente al control negativo o grupo no tratado desafiado, mientras que los valores finales más altos se observan para los grupos F, con probiótico y vacuna, y el H, alimentado con probiótico y antibiótico y vacunado.

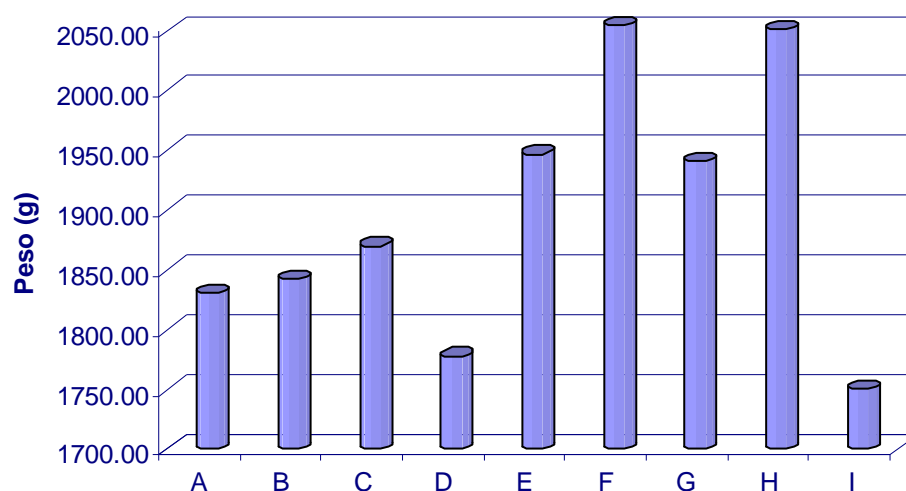


Figura 9.- Peso promedio de los pollos de cada tratamiento obtenido al final del experimento, el día 42.

VII.4.B) *Conversión de alimento*

En cada comedero se sirvió un total de 5kg de alimento preiniciador correspondiente a cada tratamiento, a medida que los animales consumían el alimento se llenaban las demandas de los animales. En la tabla XI se muestra el resultado del cálculo del alimento

promedio consumido por cada pollo obtenido a partir de la diferencia entre el total del alimento ofrecido en la semana y el alimento que no consumieron los pollos al final de la misma, entre el número de aves al principio de la semana, a pesar de los decesos observados para no sobreestimar el consumo por ave. También se muestra el consumo diario promedio por ave (Fig.10).

Tabla XI.- Alimento promedio en gramos consumido semanalmente por ave y consumido diario por cada pollo en cada uno de los nueve tratamientos, A a I, durante las seis semanas de experimento.

Tratamiento	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6	
	Por ave	Por ave/día	Por ave	Por ave/día	Por ave	Por ave/día	Por ave	Por ave/día	Por ave	Por ave/día	Por ave	Por ave/día
A (NTND)	106.90	15.27	275.86	39.41	500.77	71.54	495.38	70.77	857.14	122.45	1190.48	170.07
B (VD)	118.97	17.00	271.43	38.78	505.60	72.23	452.40	64.63	900.00	128.57	1263.16	180.45
C (AD)	121.55	17.36	295.69	42.24	479.26	68.47	480.00	68.57	904.76	129.25	1190.48	170.07
D (VAD)	112.93	16.13	310.52	44.36	482.22	68.89	488.46	69.78	904.76	129.25	952.38	136.05
E (PD)	125.00	17.86	297.41	42.49	504.81	72.12	485.93	69.42	818.18	116.88	909.09	129.87
F (PVD)	113.79	16.26	314.29	44.90	504.23	72.03	491.92	70.27	900.00	128.57	1250.00	178.57
G (PAD)	114.66	16.38	286.38	40.91	463.85	66.26	452.40	64.63	1000.00	142.86	1315.79	187.97
H (PVAD)	126.72	18.10	350.89	50.13	544.62	77.80	513.08	73.30	904.76	129.25	1190.48	170.07
I (NTD)	100.00	14.29	279.31	39.90	425.93	60.85	537.04	76.72	818.18	116.88	1090.91	155.84

* NT= No tratado; ND= No desafiado (no infectado con coccidia); D= Desafiado (infectado con coccidia); V= Vacunado; A= Suplementado con antibiótico; P= Suplementado con probiótico.

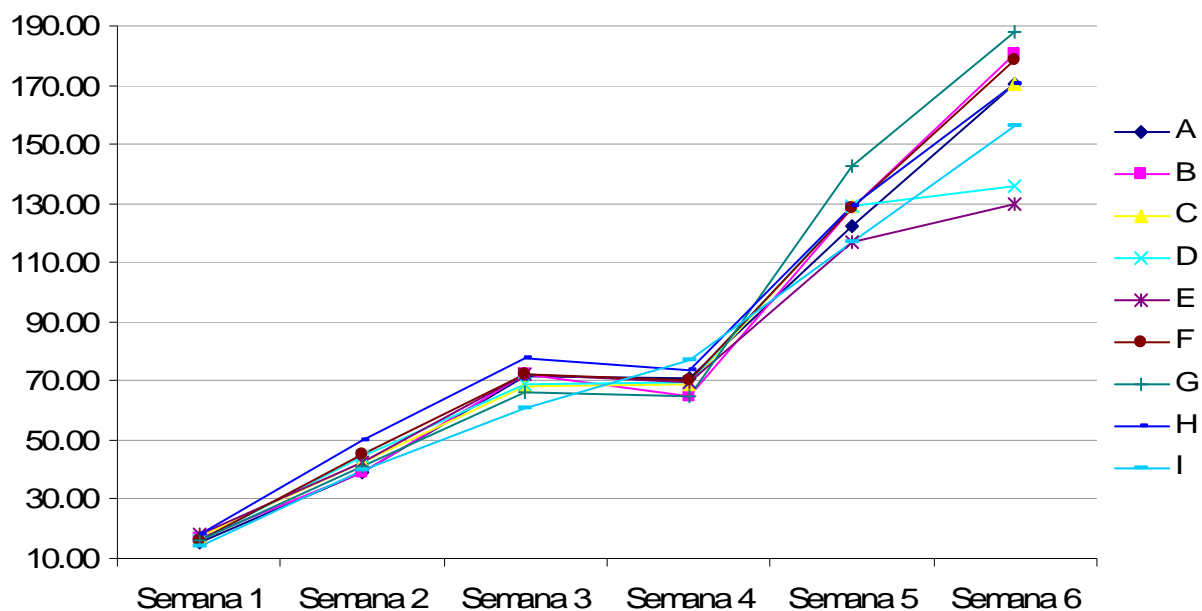


Figura 10.- Consumo de alimento promedio diario por pollo para cada uno de los siete tratamientos B-H y los dos controles A e I.

Con la información anterior y teniendo el peso promedio semanal por pollo, se realizó el cálculo de la conversión alimenticia semanal por pollo para cada uno de los tratamientos, lo cuál se muestra en la tabla XII.

Tabla XII.- Conversión alimenticia dado como el alimento consumido por pollos semanalmente entre el peso ganado por pollo por semana para cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	Promedio
A (NTND)	1.46	1.57	1.64	1.22	1.49	0.73	1.35
B (VD)	1.47	1.64	1.39	0.93	2.01	0.64	1.35
C (AD)	1.40	1.58	1.54	0.98	1.66	0.84	1.33
D (VAD)	1.61	1.61	1.71	0.98	1.58	0.45	1.32
E (PD)	1.25	1.59	1.50	0.97	1.75	0.95	1.33
F (PVD)	1.67	2.01	1.38	0.91	1.76	0.87	1.43
G (PAD)	1.50	1.60	1.56	0.94	1.73	1.06	1.40
H (PVAD)	1.49	1.81	1.53	0.80	1.95	0.85	1.40
I (NTD)	1.43	1.60	1.74	1.17	1.31	0.88	1.35

* NT= No tratado; ND= No desafiado (no infectado con coccidia); D= Desafiado (infectado con coccidia); V= Vacunado; A= Suplementado con antibiótico; P= Suplementado con probiótico.

VII.4.C) *Sobrevivencia*

Se recibieron los pollos y se mantuvieron en baterías con la calefacción necesaria. El tratamiento comenzó cuando los pollos cumplieron un día de nacidos. No se observó ningún deceso en este plazo, pero cabe mencionar que en cada corral quedaron sólo 29 individuos debido a que se tomó uno para sacrificio con el fin de observar el estado inicial general e intestinal de los pollos. En la tabla XIII se resume el número de decesos observados a lo largo del experimento, mostrando en la última columna el número de pollos que sobrevivieron hasta el final de los tratamientos al día 42. Los organismos que fallecieron fueron debido a ascitis y factores genéticos, ninguno por coccidiosis por lo que la sobrevivencia en general fue alta (Fig.11).

Tabla XIII.- Número de decesos semanales para cada tratamiento, A a I, contabilizados durante los 42 días de tratamiento. S=Semana; %= Porcentaje de supervivencia; N_{final}= número de individuos que sobrevivieron al final del experimento.

Tratamiento	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	Total	%	N _{Final}
A (NTND)	0	1	0	0	0	0	1	95.5	21
B (VD)	1	1	0	0	1	0	3	86.4	19
C (AD)	0	0	0	1	0	0	1	95.5	21
D (VAD)	0	0	1	0	0	1	2	90.9	20
E (PD)	0	0	0	0	0	0	0	100.0	22
F (PVD)	1	0	0	1	0	1	3	86.4	19
G (PAD)	0	1	1	1	0	0	3	86.4	19
H (PVAD)	1	0	0	0	0	0	1	95.5	21
I (NTD)	0	0	0	0	0	1	1	95.5	21

* NT= No tratado; ND= No desafiado (no infectado con coccidia); D= Desafiado (infectado con coccidia); V= Vacunado; A= Suplementado con antibiótico; P= Suplementado con probiótico.

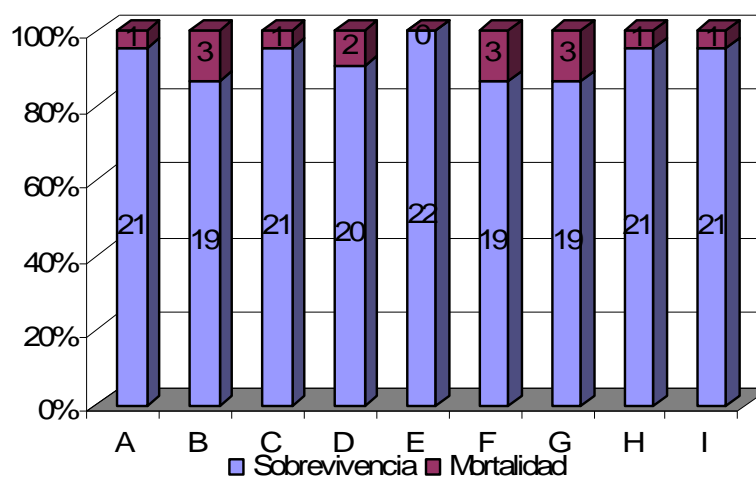


Figura 11.- Número de pollos sobrevivientes al final del experimento y número total de decesos encontrados en cada corral, A-I.

VII.5 Parámetros Fisiológicos de Respuesta a los Tratamientos

En la figura 12 se observan las gráficas correspondientes a los diferentes parámetros plasmáticos correspondientes a los días 14, 28 y 42 para los tratamientos de la A a la I.

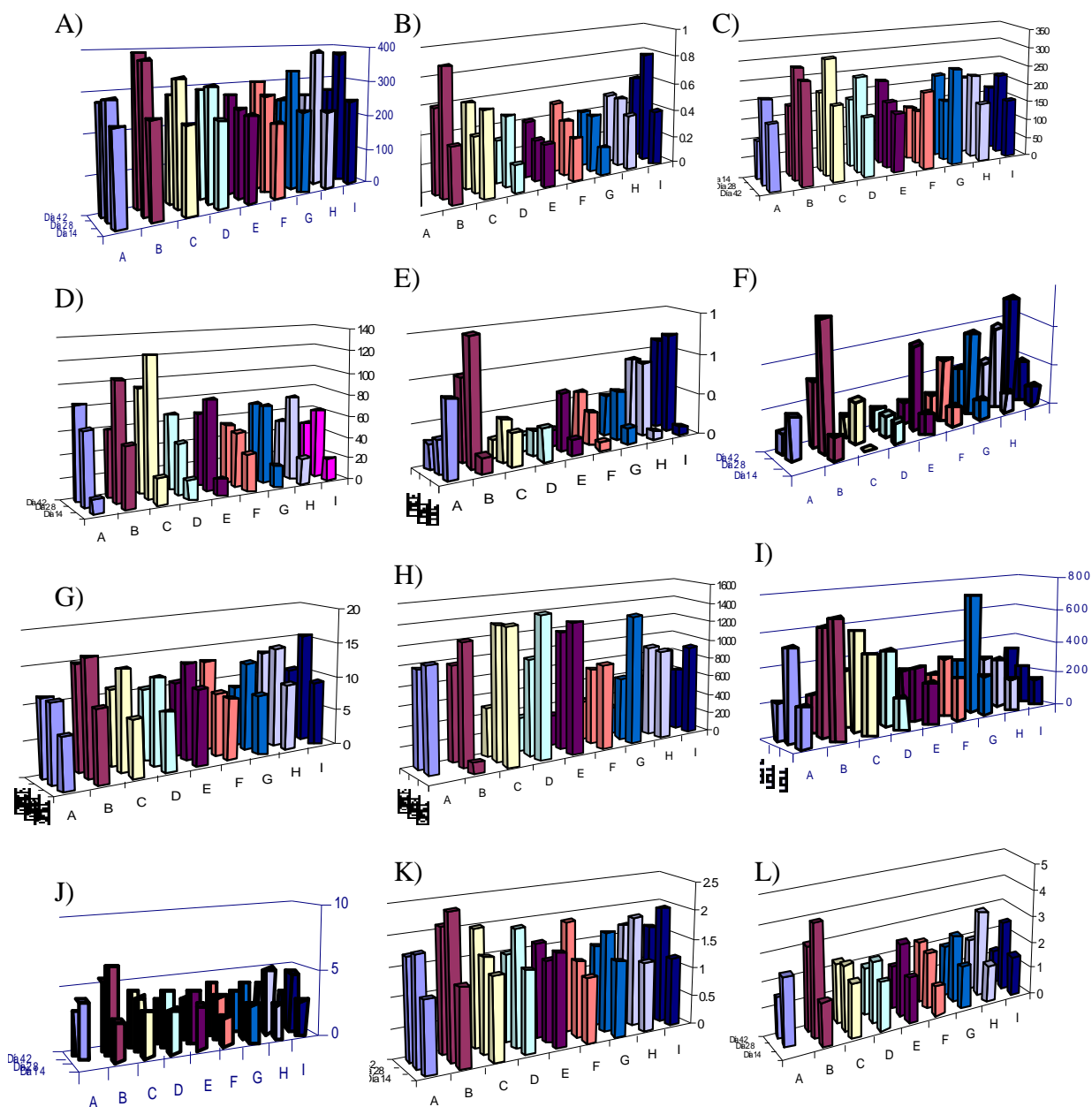


Figura 12.- Concentraciones plasmáticas de: A) Glucosa, B) Creatinina, C) Colesterol, D) Triglicéridos, E) Bilirubina total, F) Bilirubina directa, G) Calcio, H) LDH, I) AST, J) Proteínas totales, K) Albúmina y L) Globulina, de las muestras tomadas los días 14, 28 y 42.

El día uno se observaron necropsias de cada grupo para conocer las condiciones iniciales en que se encontraban los pollos. A lo largo del tratamiento solo se observaron lesiones inespecíficas en general, sin preferencias por ningún grupo.

Se tomaron los pH correspondientes a cada una de las porciones del intestino (duodeno, yeyuno, íleon y ciegos) que fueron iguales al principio para todos los tratamientos (Tabla XIV). El primer día se observó el estado de los intestinos, los cuáles se mostraban de coloración rosa tenue sin lesiones ni hinchazón, y los órganos circundantes se veían normales.

Tabla XIV.- Valores de pH para las diferentes porciones intestinales: D=duodeno, Y=yeyuno, Í=íleon y C=ciegos, correspondientes a las necropsias por tratamiento.

Tratamiento	Día 1				Día 14				Día 28				Día 42			
	D	Y	Í	C	D	Y	Í	C	D	Y	Í	C	D	Y	Í	C
A (NTND)	6.5	7.5	8.5	6.5	6.0	6.0	7.5	6.0	6	6	7.5	7	5.0	6.0	6.5	7.5
B (VD)	6.5	7.5	8.5	6.5	6.0	5.5	7.0	6.0	6	6	7.0	6	6	6	6.0	7.0
C (AD)	6.5	7.5	8.5	6.5	6.0	5.5	7.0	5.5	6	6	7.0	6	6	5.5	6.0	7.5
D (VAD)	6.5	7.5	8.5	6.5	6.5	6.0	7.0	6.0	6	6	7.0	6.5	6	5.5	6.0	7.5
E (PD)	6.5	7.5	8.5	6.5	5.5	6.0	7.0	5.5	6	6	7.0	6.5	6	5.5	6.0	7.5
F (PVD)	6.5	7.5	8.5	6.5	6.0	5.5	7.5	6.0	6	6	8	7	6	6.0	6.0	7.5
G (PAD)	6.5	7.5	8.5	6.5	6.0	5.5	7.5	6.0	6	6	7.5	7	6	5.5	6.0	7.5
H (PVAD)	6.5	7.5	8.5	6.5	6.0	5.5	6.0	6.0	6	6	6.0	7	6	5.5	6.5	7.5
I (NTD)	6.5	7.5	8.5	6.5	6.0	5.5	6.0	6.5	7	7	6.0	8	6	5.5	6.0	7.5

* NT= No tratado; ND= No desafiado (no infectado con coccidia); D= Desafiado (infectado con coccidia); V= Vacunado; A= Suplementado con antibiótico; P= Suplementado con probiótico.

VII.6 Parámetros de potencial anticoccidiano

VII.6.A) *Lesiones intestinales*

En la tabla XV, se presentan las valoraciones dadas al daño intestinal encontrado en cinco pollos seleccionados aleatoriamente de cada corral el día 28 de tratamiento, ya que es en este día donde se observan los daños ocasionados por los parásitos del género *Eimeria* en el tracto intestinal de los pollos. Como era de esperarse el mayor daño se encontró en el grupo control I, el cuál no contaba con ninguna protección contra el parásito, alcanzando un daño promedio de 9.4, seguido por C con un valor de 5.2, E de 4.2, G con 3.4, H con 2.6, F con un valor de 2.4, D con 1.4, B con un daño ponderado en 1.2 y finalmente A con un valor de cero debido a que no hubo exposición ni contaminación. De la misma manera se observa que el mayor daño fue encontrado en la porción del intestino correspondiente al yeyuno, seguido por el daño en los ciegos y el menor daño se encontró en el duodeno, sin daño alguno en íleon. Lo anterior corresponde a que el mayor daño fue ocasionado por *E. maxima*, seguido de *E. tenella* y la menos dañina fue la especie *E. acervulina*. Solo en el caso del grupo C el mayor daño fue encontrado en duodeno y ciegos, y en el grupo G se encontró mayor daño en los ciegos.

Tabla XV.- Índice de lesiones intestinales ocasionadas por las especies *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* encontradas en cinco pollos seleccionados aleatoriamente de cada grupo, el día 28 de tratamiento.

Tratamiento	Muestra	Duodeno	Yeyuno	Íleon	Ciegos	TOTAL
A (NTND)	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0
B (VD)	1	0	+	0	0	1
	2	0	+	0	+	2
	3	0	0	0	0	0
	4	0	+	0	0	1
	5	0	+	0	+	2
C (AD)	1	++	++	0	++	6
	2	+	++	0	+	4
	3	++	+	0	+++	6
	4	+++	+	0	++	6
	5	+	++	0	+	4
D (VAD)	1	0	+	0	+	2
	2	0	0	0	0	0
	3	0	+	0	0	1
	4	+	0	0	+	2
	5	0	++	0	0	2
E (PD)	1	0	+++	0	++	5
	2	0	++	0	+	3
	3	+	+++	0	+	5
	4	0	+	0	+++	4
	5	+	+	0	++	4
F (PVD)	1	+	++	0	+	4
	2	0	++	0	0	2
	3	0	+	0	0	1
	4	+	++	0	+	4
	5	0	+	0	0	1
G (PAD)	1	+	+	0	+++	5
	2	0	+	0	++	3
	3	+	+	0	+++	5
	4	0	0	0	++	2
	5	0	0	0	++	2
H (PVAD)	1	+	++	0	++	5
	2	0	+	0	+	2
	3	0	+	0	0	1
	4	+	++	0	+	4
	5	0	+	0	0	1
I (NTD)	1	+++	++++	0	+++	10
	2	++	+++	0	++++	9
	3	++++	++++	0	++++	12
	4	++	+++	0	++	7
	5	+++	+++	0	+++	9

* NT= No tratado; ND= No desafiado (no infectado con coccidia); D= Desafiado (infectado con coccidia); V= Vacunado; A= Suplementado con antibiótico; P= Suplementado con probiótico.

Para una mejor visualización de los valores proporcionados en la tabla XV, se presenta el porcentaje correspondiente a los mismos en la tabla XVI, donde se observa que los mayores porcentajes de lesiones se observan en el yeyuno en casi todos los tratamientos desafiados a excepción del tratamiento C, donde se observa la misma proporción de daño intestinal tanto en duodeno como en ciegos, y en el tratamiento G, donde el máximo grado de lesiones se observó en los ciegos.

Tabla XVI.- Porcentaje de lesiones observadas en cada porción intestinal de los pollos sacrificados el día 28 de tratamiento.

Tratamiento	Duodeno	Yeyuno	Íleon	Ciegos
A (NTND)	0	0	0	0
B (VD)	0.0	66.7	0.0	33.3
C (AD)	34.6	30.8	0.0	34.6
D (VAD)	14.3	57.1	0.0	28.6
E (PD)	9.5	47.6	0.0	42.9
F (PVD)	16.7	66.7	0.0	16.7
G (PAD)	11.8	17.6	0.0	70.6
H (PVAD)	15.4	53.8	0.0	30.8
I (NTD)	29.8	36.2	0.0	34.0

* NT= No tratado; ND= No desafiado (no infectado con coccidia); D= Desafiado (infectado con coccidia); V= Vacunado; A= Suplementado con antibiótico; P= Suplementado con probiótico.

VII.6.B) Cuantificación de ooquistes

La vacuna aplicada, COCCIVAC, se compone por tres especies del género *Eimeria* que son *E. acervulina*, *E. tenella* y *E. maxima*, por lo que se esperaba encontrar ooquistes correspondientes a dichas especies solamente en los grupos vacunados antes del desafío. A la primera semana de vacunación sólo se observaron los ooquistes correspondientes a *E.*

acervulina (Tabla XVII), y no se observó contaminación en el resto de los grupos no vacunados incluyendo los controles.

Tabla XVII.- Número de ooquistes por gramo de heces correspondiente a las diferentes especies del género *Eimeria*, las muestras fueron tomadas de cada corral el día siete de tratamiento (semana 1).

Tratamiento	<i>acervulina</i>	<i>tenella</i>	<i>maxima</i>	<i>necatrix</i>	<i>praecox</i>	<i>brunetti</i>	TOTAL
A (NTND)	0	0	0	0	0	0	0
B (VD)	13000	0	0	0	0	0	13000
C (AD)	0	0	0	0	0	0	0
D (VAD)	200	0	0	0	0	0	200
E (PD)	0	0	0	0	0	0	0
F (PVD)	10000	0	0	0	0	0	0
G (PAD)	0	0	0	0	0	0	0
H (PVAD)	900	0	0	0	0	0	0
I (NTD)	0	0	0	0	0	0	0

* NT= No tratado; ND= No desafiado (no infectado con coccidia); D= Desafiado (infectado con coccidia); V= Vacunado; A= Suplementado con antibiótico; P= Suplementado con probiótico.

A partir de la segunda semana de haber sido vacunados se comenzaron a observar ooquistes correspondientes a las especies *E. maxima* y *tenella* (Tabla XVIII).

Tabla XVIII.- Número de ooquistes por gramo de heces correspondiente a las diferentes especies del género *Eimeria*, las muestras fueron tomadas de cada corral el día 14 de tratamiento (semana 2).

Tratamiento	<i>acervulina</i>	<i>tenella</i>	<i>maxima</i>	<i>necatrix</i>	<i>praecox</i>	<i>brunetti</i>	TOTAL
A (NTND)	0	0	0	0	0	0	0
B (VD)	60000	12000	200	0	0	0	72200
C (AD)	0	0	0	0	0	0	0
D (VAD)	0	0	0	0	0	0	0
E (PD)	0	0	0	0	0	0	0
F (PVD)	250000	10000	600	0	0	0	260600
G (PAD)	0	0	0	0	0	0	0
H (PVAD)	0	0	0	0	0	0	0
I (NTD)	0	0	0	0	0	0	0

* NT= No tratado; ND= No desafiado (no infectado con coccidia); D= Desafiado (infectado con coccidia); V= Vacunado; A= Suplementado con antibiótico; P= Suplementado con probiótico.

La siguiente semana se observó ya la presencia de *E. maxima* (Tabla XIX), y en la tabla XX se observa la liberación de ooquistes semanal cuantificada en cada corral el día 28. Posteriormente no se observan más quistes en las muestras de heces en ningún tratamiento.

Tabla XIX.- Número de ooquistes por gramo de heces correspondiente a las diferentes especies del género *Eimeria*, las muestras fueron tomadas de cada corral el día 21 de tratamiento (semana 3).

Tratamiento	<i>acervulina</i>	<i>tenella</i>	<i>maxima</i>	<i>necatrix</i>	<i>praecox</i>	<i>brunetti</i>	TOTAL
A (NTND)	0	0	0	0	0	0	0
B (VD)	26000	200	0	0	0	0	26200
C (AD)	0	0	0	0	0	0	0
D (VAD)	28000	0	0	0	0	0	28000
E (PD)	0	0	0	0	0	0	0
F (PVD)	11000	0	200	0	0	0	11200
G (PAD)	0	0	0	0	0	0	0
H (PVAD)	58000	0	100	0	0	0	58100
I (NTD)	0	0	0	0	0	0	0

* NT= No tratado; ND= No desafiado (no infectado con coccidia); D= Desafiado (infectado con coccidia); V= Vacunado; A= Suplementado con antibiótico; P= Suplementado con probiótico.

Tabla XX.- Número de ooquistes por gramo de heces correspondiente a las diferentes especies del género *Eimeria*, las muestras fueron tomadas de cada corral el día 28 de tratamiento (semana 4).

Tratamiento	<i>acervulina</i>	<i>tenella</i>	<i>maxima</i>	<i>necatrix</i>	<i>praecox</i>	<i>brunetti</i>	TOTAL
A (NTND)	0	0	0	0	0	0	0
B (VD)	480000	8000	10000	0	0	0	498000
C (AD)	360000	420000	80000	0	0	0	860000
D (VAD)	13000	52000	8000	0	0	0	73000
E (PD)	400000	360000	50000	0	0	0	810000
F (PVD)	0	60000	5000	0	0	0	65000
G (PAD)	7000	90000	10000	0	0	0	107000
H (PVAD)	2000	150000	5000	0	0	0	157000
I (NTD)	1450000	800000	250000	0	0	0	2500000

* NT= No tratado; ND= No desafiado (no infectado con coccidia); D= Desafiado (infectado con coccidia); V= Vacunado; A= Suplementado con antibiótico; P= Suplementado con probiótico.

El día 28 corresponde a los siete días postdesafío, por lo tanto se refiere al día de mayor liberación de ooquistes, no obstante, esta liberación es desigual respecto a la especie, por lo que a continuación se presenta el porcentaje de los ooquistes totales contabilizados el día 28 de tratamiento correspondiente a cada una de las tres especies observadas.

Tabla XXI.- Porcentaje por especie de ooquistes por gramo de heces liberados el día 28 para cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	<i>acervulina</i>	<i>maxima</i>	<i>tenella</i>
A (NTND)	0	0	0
B (VD)	96.4	2.0	1.6
C (AD)	41.9	9.3	48.8
D (VAD)	17.8	11.0	71.2
E (PD)	49.4	6.2	44.4
F (PVD)	0.0	7.7	92.3
G (PAD)	6.5	9.3	84.1
H (PVAD)	1.3	3.2	95.5
I (NTD)	58.0	10.0	32.0

* NT= No tratado; ND= No desafiado (no infectado con coccidia); D= Desafiado (infectado con coccidia); V= Vacunado; A= Suplementado con antibiótico; P= Suplementado con probiótico.

En la tabla XXI se observa que el mayor porcentaje de ooquistes liberados en los tratamientos B, E e I corresponden a *E. acervulina*, mientras que para C, D, F, G y H domina la liberación de ooquistes de *E. tenella*, en el caso de E. maxima ningún tratamiento mostró una mayor proporción de ooquistes liberados.

Aunado a las liberación de quistes, el día 28 de tratamiento se observó el piso de los corrales y se encontraron excretas características de la enfermedad, las cuáles se calificaron de acuerdo a su severidad, es decir, a la presencia de sangre, a la coloración anormal, y a la cantidad de excreta anormal. Las características de las excretas pueden ayudar a la identificación de la especie en el diagnóstico del daño, de esta forma, si se observa un líquido lechoso blancuzco sobre las heces, se puede inferir que es debido al daño ocasionado por *E. acervulina*, mientras que si el líquido es de un tono anaranjado, se trata de *E. maxima*, y si se observan las heces hidratadas con sangre, el daño es debido a *E. tenella*, sin embargo, esta información no se expresa en el índice debido a que éste se considera como un valor general promedio ya que en ocasiones se presenta una combinación en el aspecto de las excretas denotando el daño por más de una especie. En la tabla XXII se presenta el índice de excretas valorado para cada corral, donde se observa que el mayor daño se presenta en el corral del control I, seguido de C, mientras que en los demás corrales el valor fluctúa de uno a tres.

Tabla XXII.- Índice de excretas encontrada en cada corral el día 28 de tratamiento.

Tratamiento	<i>E. acervulina</i>	<i>E. maxima</i>	<i>E. tenella</i>	Total	Total
A (NTND)	0	0	0	0	0
B (VD)	0	0	+	+	1
C (AD)	+++	+	+++	+++++++	7
D (VAD)	0	+	+	++	2
E (PD)	0	0	++	++	2
F (PVD)	0	+	0	+	1
G (PAD)	0	0	+	+	1
H (PVAD)	0	++	+	+++	3
I (NTD)	++	+++	+++	+++++++	8

* NT= No tratado; ND= No desafiado (no infectado con coccidia); D= Desafiado (infectado con coccidia); V= Vacunado; A= Suplementado con antibiótico; P= Suplementado con probiótico.

VII.6.C) Cálculo del índice anticoccidial

Considerando la sobrevivencia como parámetros productivos indicadores de eficacia del tratamiento y el índice de ooquistes y de lesiones como parámetros indicadores de la capacidad protectora contra los daños a causa de las diferentes especies de *Eimeria*, se calculó el índice anticoccidial (Tabla XXIII) el cuál muestra que el administrar el probiótico en el alimento logra una capacidad protectora equiparable a los tratamientos que integran una protección específica hacia la coccidiosis (vacuna $\%$ antibiótico).

Tabla XXIII.- Parámetros para el cálculo del índice anticoccidial para probar el efecto del tratamiento con probiótico en contraste con la dieta basal. IAC=Índice anticoccidial.

Tratamiento	% Supervivencia	% Ganancia relativa peso	Índice ooquistes	Índice lesiones	IAC
B (VD)	86.4	100.73	8.15	0.63	178.31
C (AD)	95.5	102.20	13.68	2.48	181.50
D (VAD)	90.9	96.94	1.40	0.70	185.75
E (PD)	100.0	106.52	16.90	1.91	187.71
F (PVD)	86.4	117.36	4.67	1.26	197.79
G (PAD)	86.4	106.10	8.86	1.79	181.81
H (PVAD)	95.5	112.43	3.45	1.24	203.19

*Valores de referencia: >180 = BUENO; 160-180 = MODERADO; <160 = POBRE

VII.7 Sistema biovector de entrega

Con el fin de mejorar genéticamente la cepa probiótica para potencializar su capacidad inmunoestimuladora y hacer más específica la respuesta hacia la coccidiosis, se propuso la construcción de un sistema acarreador de las proteínas antigénicas NA4 y TA4, fusionadas a las proteínas de cubierta *cotB* y *cotC* de *B. subtilis*. Esta construcción se integraría por recombinación homóloga del plásmido pDG1662 conteniendo la fusión en el espacio contenido entre las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RV (Fig.13) con la porción cromosomal de *B. subtilis* correspondiente a *amyE*.

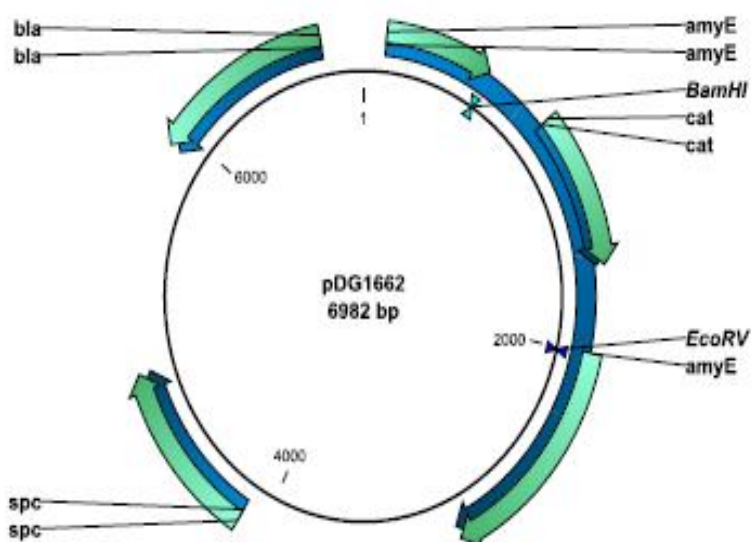


Figura 13.- Esquema del plásmido pDG1662, mostrando la ubicación de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RV y la porción correspondiente a *amyE*.

VII.8 Extracción de DNA cromosomal

Empleando la metodología descrita para la extracción de DNA cromosomal correspondiente a *B. subtilis*, se obtuvo exitosamente el material genético de la bacteria suficiente para la amplificación de los productos esperados. Se emplearon dos cepas para la extracción, una denominada BB80 y la cepa LM-4.

Por otro lado, no se obtuvieron los mismos resultados para la coccidia. Para la extracción del DNA de coccidia se emplearon dos muestras, la primera correspondiente a la especie *E. tenella* y la segunda correspondiente a *E. acervulina*. Tal vez no se obtuvo el producto esperado debido a un gran número de DNAsas resistentes a los tratamientos probados para la extracción. Solamente se logró obtener RNA, por lo que no se pudo continuar con la amplificación de los productos antigénicos correspondientes al género *Eimeria*.

VII.9 Amplificación de *cotC*, *cotB*

Empleando el DNA extraído de *B. subtilis* tanto de la cepa BB80 como de la LM-4, se realizó la amplificación de los fragmentos codificadores para las proteínas de cubierta *cotB* y *cotC*, empleando los oligonucleótidos que se diseñaron para ello (BBHI, BTA4, CBHI y CTA4), obteniendo los fragmentos del tamaño esperado (Fig.14) según se indicó en la tabla V. Solamente en el caso de la amplificación de *cotB* con el DNA de la cepa LM-4 no se obtuvo producto de amplificación, tal vez debido a que la secuencia es diferente por lo que tal vez sea necesario desarrollar oligonucleótidos degenerados para probar la presencia de esta proteína en la cepa.

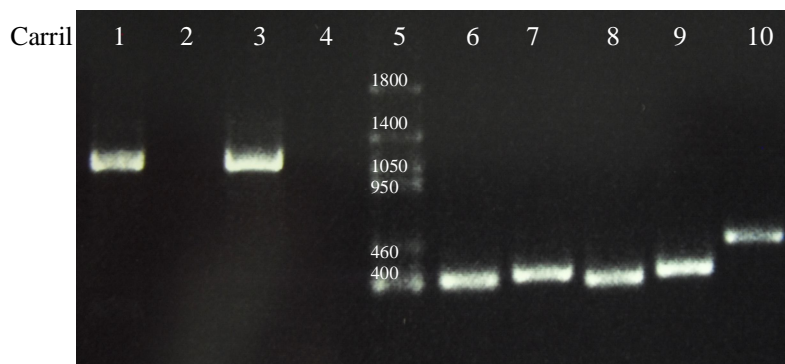


Figura 14.- Gel de agarosa al 1.2% donde se observan los productos de PCR correspondientes a: carril 1: *cotB* amplificado de BB80 con los oligos 5'BBHI y 3'BNA4; carril 2: *cotB* amplificado de LM-4 con los oligos 5'BBHI y 3'BNA4; carril 3: *cotB* amplificado de BB80 con los oligos 5'BBHI y 3'BTA4; carril 4: *cotB* amplificado de LM-4 con los oligos 5'BBHI y 3'BTA4; carril 5: escalera (los números indican las pares de bases a que equivale cada banda); carril 6: *cotC* amplificado de BB80 con los oligos 5'CBHI y 3'CNA4; carril 7: *cotC* amplificado de LM-4 con los oligos 5'CBHI y 3'CNA4; carril 8: *cotC* amplificado de BB80 con los oligos 5'CBHI y 3'CTA4; carril 9: *cotC* amplificado de LM-4 con los oligos 5'CBHI y 3'CTA4; carril 10: control, amplificado de LM-4 con los oligos 5'16SF y 3'Bseq1, para identificación del género *Bacillus*.

VIII. DISCUSIÓN

PRIMERA PARTE.- SELECCIÓN DE CEPAS DE *B. subtilis*

Un buen probiótico es un organismo que vive en simbiosis con otro el cual le proporciona un medio para vivir y multiplicarse, de manera que el huésped le brinda al hospedero determinados beneficios sin afectar los procesos fisiológicos normales del organismo.

Para ser considerado como probiótico, un organismo debe reunir una serie de características. Para comenzar, debe ser un organismo inocuo, es decir, considerado seguro para su consumo tanto para animales como para humanos. Para poder mejorar el estado de salud de su hospedero, se busca que un probiótico produzca metabolitos que ayuden a mejorar la digestión y absorción de nutrientes e incrementen el crecimiento y viabilidad de la microflora intestinal del hospedero para contribuir así a la condición nutricional del hospedero. Los organismos probióticos requieren una cierta resistencia que les permita sobrevivir a los fuertes ácidos estomacales e intestinales, además de las sales biliares y colonizar de manera no permanente el intestino del hospedero. Además, se espera que cuente con capacidades antibióticas ya sea por exclusión competitiva o mediante la producción de factores antimicrobiales. Finalmente, la estimulación del sistema inmune mediante la promoción de la maduración de las células precursoras de linfocitos, presentes en los parches de Peyer puede ser promovida por la presencia de organismos probióticos (Britton y Versalovic, 2008).

Básicamente se busca que el organismo en cuestión sea capaz de colonizar de manera no permanente el epitelio gastrointestinal, que contribuya en el aspecto nutricional al hospedero, que produzca sustancias inhibitoras que funcionen como antimicrobiales y que presente una función inmunoestimuladora al estimular la maduración de linfocitos (Tinh *et al.*, 2007).

El uso de *B. subtilis* como probiótico se justifica debido a su calidad de GRAS, es decir, por ser considerado como seguro. En este trabajo, mediante una serie de bioensayos, se buscó comprobar el potencial probiótico de cepas de *B. subtilis* mediante la selección por

sus capacidades de producir enzimas degradativas con el fin de que su producción pueda mejorar la digestión y absorción de nutrientes de los pollos (*Gallus gallus*).

En este trabajo se puso a prueba la capacidad no solo de sobrevivencia, sino de crecimiento de las colonias de este microorganismo a un rango de pH de 5.5 a 7.5 (Tabla VIII) para poder inferir si es capaz de sobrevivir y colonizar en las condiciones de acidez estomacal e intestinal de pollos de engorda. No obstante, no se esclareció si *B. subtilis* no coloniza de manera permanente el intestino del hospedero, para lo cuál faltaría tomar muestras de los diferentes segmentos intestinales para la búsqueda de dicho microorganismo tras una sola inoculación, así como la contabilización de las unidades formadoras de colonia UFC de *B. subtilis* presentes tanto en el intestino como en heces.

También se consideraron las capacidades antibióticas de *B. subtilis* al inhibir o limitar el crecimiento de otros microorganismos.

VIII.1 Selección de cepas por sus potenciales enzimáticos

El género *Bacillus* y en particular *B. subtilis* ha sido ampliamente aplicado en procesos industriales (Steinmetz *et al.*, 1985; Kalisz, 1988; Godfrey y West 1996; Kirk y Jeffries. 1996; Kumar *et al.*, 1998; Schallmey *et al.*, 2004) que se valen de la producción de enzimas microbianas aprovechando que estos organismos pueden ser encontrados en diversos ambientes (Chandrasekaran, 1997) y producen enzimas con mayor resistencia a pH y temperatura (Zamost *et al.*, 1991; Kaur *et al.*, 2001; Brayan *et al.*, 2004). Entre las enzimas bacterianas más deseables para su aplicación en la industria se encuentran las proteasas (Underkofler *et al.*, 1956; Outtrup and Boyce 1990; Kudrya y Simonenko, 1994; Rao *et al.*, 1998; Kumar y Takagi, 1999; Gupta *et al.*, 2002; Brayan *et al.*, 2004), carbohidrasas, dentro de las cuales la principal es la amilasa (Underkofler *et al.*, 1956; Marco *et al.*, 1996; Vieira de Carvalho *et al.*, 2008), y lipasas (Alford *et al.*, 1964; Lesuisse *et al.*, 1993; Ghosh *et al.*, 1996; Jaeger y Reetz, 1998; Pandey *et al.*, 1999; Nawani y Kaur, 2000; Nthangeni *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 2003; Hasan *et al.*, 2006). La gran diversidad

metabólica encontrada en las especies de *Bacillus* ofrece un amplio rango de degradación de sustratos.

Entre los efectos más deseables proporcionados por el microorganismo probiótico se encuentran el mejorar la digestibilidad del hospedero, esto gracias a que las enzimas producidas por el probiótico sirven como complemento a las enzimas endógenas del hospedero, actuando en conjunto en el proceso de asimilación del alimento, teniendo las proteínas exógenas la ventaja de ser más resistentes al pH lo que les permite funcionar a lo largo del tracto digestivo donde las enzimas nativas no pueden trabajar (Brayan *et al.*, 2004).

Al formular una dieta para alimentar pollos de engorda es necesario tomar en cuenta el balance de los componentes de modo que sean suficientes para, junto con el agua administrada *ad libitum*, satisfacer los requerimientos energéticos y nutrimentales del ave a las diferentes etapas de crecimiento. Tradicionalmente, el alimento está conformado por una mezcla de granos de cereal, soya, productos animales, grasas y vitaminas y minerales premezclados. Una dieta balanceada permitirá el óptimo crecimiento del ave, así como un buen estado de salud y reproductivo, abasteciendo la energía necesaria para el mantenimiento metabólico, dicha energía proviene principalmente de los carbohidratos y grasas, pero también de las proteínas. Un crecimiento lento y pérdida de vigor normalmente se encuentran asociados a una mala nutrición (Subcommittee on Poultry Nutrition, 1994) lo que se traduce en una carente absorción de los nutrientes del alimento. Las especies del género *Eimeria* se introducen a las células intestinales impidiendo que el pollo pueda aprovechar los nutrientes, lo cuál representa una de las causas que pueden llevar a la desnutrición a los pollos.

En este trabajo se probó la capacidad de *B. subtilis* para producir enzimas degradativas de los principales componentes en el alimento de los pollos que son proteínas, carbohidratos (principalmente almidón) y grasas, por medio de bioensayos en medio sólido LB adicionado con los distintos sustratos, y encontrando la actividad enzimática mediante la visualización de un halo de degradación (Tabla VIII).

VIII.1.A) *Proteasas*

Las proteínas y aminoácidos son los constituyentes primarios de los tejidos protectivos y estructurales (piel, plumas, ligamentos) así como de los músculos y órganos, además, fungen como precursores de diversos constituyentes de importancia metabólica. Las proteínas son sintetizadas y degradadas de manera constante para cumplir con las necesidades metabólicas del pollo, por lo que es necesaria una adecuada ingesta de aminoácidos en cantidad suficiente pero también en proporción adecuada, respecto a los aminoácidos esenciales y a los no esenciales. Los requerimientos de aminoácidos esenciales determinan los requerimientos proteicos de las aves. De modo que, si la ingesta de proteínas no es suficiente, se deteriorará el crecimiento del individuo y por ende su productividad y se afectará el desarrollo y buen funcionamiento de los órganos y tejidos no vitales dado que las pocas proteínas ingeridas se destinarán al mantenimiento de las funciones vitales. Una gran parte del incremento en peso es tejido con un alto porcentaje proteico. Una ingesta de 18 a 20 gramos es suficiente para los pollos siempre y cuando esta contenga el balance adecuado de aminoácidos esenciales. Una deficiencia en la ingesta de proteínas y/o un desbalance en el consumo de los aminoácidos esenciales, además de las deficiencias en el crecimiento, puede afectar el desarrollo del sistema reproductivo cuando las aves alcanzan su edad reproductiva y en la calidad del semen en el caso de los machos y del desarrollo de los oviductos en el caso de las hembras, y para ambos casos se puede observar un crecimiento desigual en las plumas. El consumo de alimento, sin embargo, debe ser limitado para mantener la guía de peso sugerido por los criadores de aves de corral, ya que de lo contrario las aves pueden presentar obesidad e incluso llegar a morir (Subcommittee on Poultry Nutrition, 1994), es por ello que se debe optimizar la ingesta de proteínas sin incrementar el alimento ofrecido.

Se ha comprobado que la suplementación enzimática potencializa el efecto de la restricción de alimento de los pollos sobre la actividad enzimática en la digestión y sobre la ganancia de peso (Pinheiro *et al.*, 2004). La actividad proteasa de *B. subtilis* observada en este trabajo presenta una opción para la suplementación de proteasas exógenas a través de un organismo vivo que continuamente producirá tales enzimas en el intestino del pollo,

permitiendo maximizar la utilización del alimento por el pollo, sin tener que incrementar la cantidad de alimento ingerido.

Los factores que afecten el consumo de alimento afectarán, por tanto, la ingesta de proteínas y aminoácidos (Subcommittee on Poultry Nutrition, 1994).

La suplementación con enzimas exógenas en el alimento de animales de corral, entre ellos los pollos, ha sido una útil opción para mejorar el valor productivo del alimento comercial y permitir así una mayor flexibilidad en la formulación del alimento (Silversides y Bedford, 1999; Pinheiro *et al.*, 2004).

El suplementar con proteínas exógenas el alimento de los pollos de engorda tiene por objeto el complementar el proceso de alimentación, logrando una mayor eficiencia y un uso más completo de los nutrientes. Las enzimas de origen bacteriano, junto con las fúngicas, son altamente deseables para suplementar el alimento de los pollos por su resistencia a temperaturas de hasta 80°C (Silversides y Bedford, 1999) y su resistencia a las condiciones de acidez intestinal.

De entre éstas, las proteasas y amilasas de *B. subtilis* han sido empleadas para la preparación de complejos enzimáticos empleados para mejorar la digestibilidad del alimento para pollos (Pinheiro *et al.*, 2004).

En este trabajo se comprobó la capacidad de producir enzimas tipo proteasas por parte de cepas de *B. subtilis*, mediante ensayos en un medio sólido LB en cajas Petri adicionado con leche descremada gracias a la observación de un halo de degradación que para la cepa LM-4 fue de 2mm y para la LM-6 y WT de hasta 4mm, esta capacidad se mantuvo a los 41° C y a lo largo del rango de pH probados, lo cuál indica la capacidad degradativa de proteínas por parte de *B. subtilis*, y ello facilitará la absorción de aminoácidos en el tracto intestinal de los pollos, pese a la presencia de parásitos intestinales como lo son las coccidias.

Una ingesta de 400 a 460 kcal ME por ave es adecuada para su óptimo mantenimiento. Diferentes factores, como la temperatura ambiental, pueden afectar la ingesta de alimento por parte de los pollos, manteniéndose una ingesta adecuada en un rango de temperaturas de 18 a 24° C. Fuera de este rango, a mayor temperatura menor es la ingesta de alimento y a menor temperatura se incrementa el consumo de alimento. Ambos

comportamientos modifican el porcentaje de proteínas y aminoácidos que son ingeridos, distando de los requerimientos básicos del ave (Subcommittee on Poultry Nutrition, 1994).

Ha sido comprobado que el suplementar el alimento de los pollos con enzimas exógenas (por ejemplo proteasas de *B. subtilis*) permite que no haya diferencia entre tratamientos con diferente composición energética, lo cuál implica que dichas enzimas mejoran la utilización de los nutrientes, compensando la reducción en el contenido energético (Zanella *et al.*, 1999). De esta manera se logra satisfacer las necesidades energéticas de los pollos, a pesar de la variación en la composición del alimento de los pollos, permitiendo una mayor flexibilidad en la formulación del mismo.

El tener un balance óptimo en los aminoácidos y proteínas es indispensable para su eficiente utilización en las funciones metabólicas, crecimiento y síntesis de estructuras.

Una reducción en las proteínas de la dieta significará, por tanto, la reducción de los aminoácidos esenciales, generando diferentes síntomas de deterioro en el individuo, principalmente se observará en la deficiencia en las actividades productivas, ya que la poca energía ingerida será destinada al mantenimiento de las células ya existentes y no a la producción de nuevas células, deteniendo el incremento en la masa muscular.

Silversides y Bedford (1999) probaron la eficacia de una preparación enzimática comercial que contenía proteasas de origen bacteriano. Observaron un efecto positivo en ganancia de peso y conversión alimenticia en los grupos de pollos suplementados con las enzimas. Además, observaron un efecto significativo sobre la viscosidad intestinal la cuál discuten, es la causa del incremento en la absorción alimenticia y, por ende, en el incremento en peso.

Zanella *et al.* (1999) encontraron un incremento en la digestibilidad proteica del 2.9%, un incremento en peso del 1.9% y un incremento en la conversión alimenticia del 2.2% en grupos de pollos alimentados con un suplemento enzimático que contenía proteasas de *B. subtilis*, en comparación con los grupos no suplementados con enzimas exógenas.

Por lo anterior, el implementar el uso de *B. subtilis* puede eficientizar la degradación y absorción de proteínas, ayudando a que el pollo mantenga el balance indicado de

aminoácidos y muestre, por ende, una buena e incluso mayor producción como se observó en este trabajo según se discute más adelante.

VIII.1.B) Carbohidrasas

Los carbohidratos son una importante fuente de energía para los pollos de engorda, provenientes de los granos mezclados en el alimento. La mayoría de los carbohidratos de los granos de cereal se presentan en forma de almidón, aunque también se presentan otras formas de carbohidratos en proporciones variadas como son, polisacáridos como celulosa, hemicelulosa, pentosanos y algunos oligosacáridos como la rafinosa que son escasamente digeridos por el pollo. Estos últimos pueden afectar los procesos digestivos de los pollos cuando se encuentran en gran cantidad en la dieta (Subcommittee on Poultry Nutrition, 1994).

Las amilasas producidas por *B. subtilis* presentan un alto potencial para la hidrólisis de almidón y una actividad óptima a un pH de 6.5, aunque su temperatura óptima es de 50°C (Marco *et al.*, 1996).

Al ser el almidón el principal objetivo para las enzimas degradativas normales del pollo, es necesario eficientizar su absorción, facilitándola al adicionar enzimas tipo amilasas exógenas capaces de resistir las condiciones de temperatura y pH presentes en el tracto gastrointestinal, esto puede ser logrado al administrar un organismo como lo es *B. subtilis*, el cuál se comprobó, en este trabajo, que es capaz de resistir dichas condiciones, y más aún, la producción de amilasas que se observó en los bioensayos realizados en placas Petri con LB sólido adicionado con almidón, indica su alta capacidad degradativa en las condiciones fisiológicas del pollo indicando que su administración en el alimento del pollo puede incrementar la degradabilidad del almidón.

La edad de los pollos es un factor que determina la variación en la asimilación de los nutrientes a partir del alimento, sin embargo, se ha comprobado (Zhou *et al.*, 2009) que el suplementar con enzimas exógenas incrementa la disponibilidad de energía metabolizable, en diferente proporción dependiendo de la edad del pollo, pero en todos los casos superior a los pollos no suplementados con enzimas.

Zhou *et al.* (2009) comprobaron que la adición de enzimas exógenas tales como α -amilasas (provenientes de *B. subtilis*), produce un incremento en la digestibilidad del alimento de los pollos, lo cuál permite una mayor metabolización de la energía del alimento, ya que, como ya se mencionó, el almidón es la forma más frecuente de carbohidrato presente en el alimento de los pollos.

Resultados como los de Zhou *et al.* (1999) muestran la capacidad degradativa de las enzimas de *B. subtilis*, como las α -amilasas, lo cuál ofrece una perspectiva del incremento en el valor nutritivo y la disminución en el costo de producción que ofrece el suplementar el alimento de los pollos con *B. subtilis* vivo, ya que, como se comprobó en este trabajo, éste es capaz de producir enzimas (carbohidrasas, por ejemplo) a las condiciones de temperatura y pH presentes en el tracto digestivo de los pollos

VIII.1.C) *Lipasas*

Las células pueden obtener energía mediante la oxidación de las grasas, además estas son incorporadas al cuerpo como parte del crecimiento del organismo mediante procesos anabólicos. La síntesis de ácidos grasos tiene lugar en el hígado principalmente. Cuando el ave está a punto de llegar a su madurez sexual, la síntesis de ácidos grasos en el hígado se intensifica, acumulando grasa en gran medida. El proveer de grasas en el alimento disminuye el costo de la síntesis y es más eficiente energéticamente hablando que el sintetizar las grasas a partir de las reservas de carbohidratos. La digestibilidad de las grasas depende del tipo de ácidos grasos que son ingeridos, así como su utilización posterior. La absorción de los ácidos grasos en el intestino está condicionada por la longitud de la cadena, las insaturaciones, y la naturaleza de la esterificación (Subcommittee on Poultry Nutrition, 1994).

Pinheiro *et al.*, (2004) probaron la actividad de varias enzimas, entre ellas amilasas, proteasas y lipasas en el intestino de pollos suplementados con enzimas exógenas de origen fúngico y de *B. subtilis*. Ellos encontraron una mayor actividad enzimática en los pollos suplementados con las enzimas, aunado a una mayor ganancia de peso, a diferencia de los pollos no suplementados con el complejo enzimático.

La alta capacidad degradativa y de crecimiento en un medio rico en grasas observado por *B. subtilis*, indica su potencial efecto sobre las grasas de la dieta de las aves en el tracto intestinal, facilitando su absorción aunque esta solo se probó con dos tipos de grasas, el aceite de olivo y de maíz, sin embargo, esta actividad sirve como precursora para la posible actividad lipasa sobre otro tipo de fuentes encontradas en la dieta común de los pollos, aunque faltaría probar las capacidades degradativas tipo lipasas de *B. subtilis* para diferentes longitudes de ácidos grasos y saturaciones, sin embargo se espera que estas sean suficientes para ayudar a mejorar la digestibilidad lipídica del pollo.

De acuerdo la capacidad de crecimiento y degradación de *B. subtilis*, probada en los ensayos en medio sólido AL suplementado con aceite de maíz u olivo, y según los resultados obtenidos en otros trabajos (Pinheiro *et al.*, 2004), se espera que el entregar vivo a *B. subtilis* en el alimento de pollos de engorda, logre incrementar la digestibilidad de las grasas adicionadas al alimento y de este modo disminuya el costo de la síntesis lipídica del pollo e incremente la eficiencia energética del alimento.

VIII.2 Resistencia ambiental a pH y temperatura

Los cambios en el consumo de alimento no suelen ser proporcionales a los cambios en la concentración de energía de la dieta, aunque generalmente los pollos ajustan su consumo de alimento para lograr un mínimo de ingreso de energía de dietas que contienen diferentes niveles energéticos, además otros factores que afectan el consumo de alimento, además del nivel energético de la dieta y del balance de los nutrientes, son la densidad del alimento y la temperatura ambiental, el consumo de alimento decrece a medida que la temperatura ambiental aumenta, a temperaturas por arriba de los 30° C, el consumo disminuye de 2.5 a 4 gramos por cada grado que se incrementa la temperatura (Subcommittee on Poultry Nutrition, 1994). El aporte de enzimas exógenas resulta más que deseable para mantener el balance nutrimental del ave, y más aún frente a una enfermedad cuyo principal objetivo son las células intestinales, afectando directamente en la absorción de nutrientes por parte del pollo, sobretodo debido a que dichas enzimas exógenas son capaces de soportar rangos de pH y temperatura mayores a los de las enzimas nativas,

proporcionando un amplio espectro de acción derivado en un incremento en la digestibilidad del alimento a pesar de las condiciones adversas.

Para poder ser empleado como probiótico, el microorganismo en cuestión debe ser probado para observar su estado fisiológico por lo que se requiere probar la producción de moléculas bioactivas en cultivo para cerciorarse de que producirá las mismas *in vivo* ya que es necesario determinar si el microorganismo es susceptible o resistirá los diferentes tipos de estrés ambiental a los que se sujetará a lo largo del tracto gastrointestinal (Britton y Versalovic, 2008), es por ello que se realizaron los mismos bioensayos para probar la actividad proteasa, carbohidrasa y lipasa a la temperatura fisiológica del pollo (41° C) y con el rango de acidez que puede ser observado a lo largo del tracto gastrointestinal (5.5 a 7.5). En este ensayo se observaron las mismas capacidades enzimáticas, e incluso un mayor crecimiento para la cepa LM-4 a los 41° (Tabla VIII), la cuál fue seleccionada para ser combinada con el alimento del pollo, ya que su crecimiento y producción de enzimas se encontró en un rango medio entre las otras cepas probadas, ya que LM-7 mostró el mayor crecimiento en los diferentes medios y a los 37° pero una pobre producción de enzimas, y LM-6 y WT mostraron las mayores capacidades degradativas pero con un escaso crecimiento, por lo que la mejor opción fue la cepa LM-4.

VIII.3 Potencial antimicrobiano

Otra característica deseable es el efecto inhibitor de otros microorganismos que pudiesen resultar patógenos, pues habrá una competencia por el espacio que ya estará ocupado por el probiótico (Tinh *et al.*, 2007; Britton y Versalovic, 2008).

En este rubro ya se han comprobado las capacidades antimicrobiales y la producción de bacteriocinas por parte de *B. subtilis* como se citan a continuación.

Pinchuk *et al.* (2001) encontraron la producción de al menos dos antibióticos por parte de *B. subtilis*, con la capacidad de limitar el crecimiento de *Helicobacter pylori* y de mantenerse estable en temperaturas de hasta 100° C y en un rango de pH de 3 a 10 e incluso ante la presencia de enzimas tipo proteasas.

Teo y Tan (2005) encontraron una bacteriocina producida por cepas de *B. subtilis* (PB3 y PB6) aisladas del tracto digestivo de pollos. Este antimicrobial presentó su máxima actividad a 37° C y a un pH de 6.2, cuyo efecto se extendía tanto a bacterias gram positivas como negativas que representan riesgos patogénicos para el organismo, logrando un efecto inhibitorio contra *Clostridium perfringens*, patógeno de pollos que ocasiona lesiones necróticas en las paredes intestinales e incluso puede derivar en la muerte, *C. difficile*, *C. jejuni*, *Campylobacter coli* y *Streptococcus pneumoniae*.

Fakhry *et al.* (2008) caracterizaron 25 bacterias formadoras de esporas aisladas de muestras de heces y biopsias de ileon de humanos sanos que fueron identificadas dentro de siete especies de *Bacillus*, capaces de adaptarse al ambiente intestinal, entre estas *B. subtilis*, para la cual encontraron actividad antimicrobial contra *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *S. enterica*, para las diferentes cepas aisladas.

Estas cualidades antimicrobianas hacia agentes patógenos se observó mediante el ensayo de competencia realizado empleando las bacterias aisladas de heces de pollo, clasificadas como Gram (+) y Gram (-). Todas las bacterias aisladas son agentes característicos de la microbiota intestinal de los pollos, sin embargos no todas ellas son benéficas. El crecimiento de las bacterias Gram (+) en presencia del probiótico, reflejan la capacidad de *B. subtilis* de coexistir con otras bacterias benéficas para el organismo. Por otro lado, la predominancia de la cepa probiótica, limitando el crecimiento de las bacterias entéricas Gram (-), reflejan un efecto antimicrobiano del probiótico dirigido hacia bacterias potencialmente patógenas, permitiendo el desarrollo de una microbiota más sana que, en el tracto gastrointestinal puede significar una diferencia positiva para el desarrollo del organismo hospedero.

SEGUNDA PARTE.- TRATAMIENTOS Y PARÁMETROS DE RESPUESTA

Se ha comprobado la capacidad de sobrevivencia de *B. subtilis* en las condiciones presentes a lo largo del tracto digestivo, pero además Duc *et al.* (2004) comprobaron que *B. subtilis* mostró no colonizar el tracto intestinal de ratones inoculados y el desarrollo tanto de la célula vegetativa como esporas en el tracto gastrointestinal. Esto es importante ya que se debe asegurar que este microorganismo sea capaz de realizar las diferentes actividades metabólicas y de expresión génica correspondientes a sus diferentes estadios de desarrollo al encontrarse en el intestino de los pollos.

VIII.4 Parámetros productivos

En este trabajo se buscó el objetivo de mejorar el crecimiento y eficiencia en la utilización del alimento mediante el mejoramiento de la eficiencia de la digestión, absorción de nutrientes y metabolismo de los nutrientes absorbidos, en general, gracias a la implementación de *B. subtilis* como probiótico mezclado con el alimento.

O'Dea *et al.* (2006), probaron la eficacia de dos probióticos desarrollados para mejorar el estado de salud y producción de pollos de engorda. El primer probiótico basado en *L. acidophilus*, *L. bifidus* y *Enterococcus faecalis* y el segundo probiótico consistente en *L. acidophilus*, *E. faecalis* y *Bifidobacterium sp.* A pesar de lo esperado, no encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo control, es decir, que los probióticos que probaron no tuvieron efecto en incremento de peso, peso final, menor mortalidad ni una mejor conversión alimenticia, e incluso encontraron que ninguno de los probióticos ofrecía ninguna protección del tracto gastrointestinal contra la colonización de patógenos tales como *C. perfringens* ya que encontraron enteritis necrótica sin diferencia entre los tratamientos.

Castellanos y Murguía (1999) evaluaron el probiótico MHF basado en la combinación de dextrano y oligosacáridos con glucosa como vehículo, con el cuál alimentaron pollos machos de engorda en un clima tropical seco. Hasta la quinta semana de

tratamiento encontraron la presencia intestinal de *S. enteritidis*, en cantidad significativamente menor que en los pollos que alimentaron con azúcar de caña como control. Los tratamientos con el probiótico MHF también disminuyeron la mortalidad aunque no influyó en la productividad de los pollos.

Mountzouris *et al.* (2007), a diferencia de los anteriores, sí encontraron un efecto significativo en la ganancia de peso, similar entre los tratamientos con probiótico y el tratamiento con antibiótico (avilamicina) y en la estimulación metabólica de la microflora en pollos tratados con un probiótico entregado ya sea en el alimento o en el agua, compuesto por *L. reuteri*, *E. faecium*, *B. animalis*, *Pediococcus acidilactici* y *L. salivarius*, aislados de las distintas porciones intestinales de pollos maduros sanos.

Al igual que en Mountzouris *et al.* (2007), en este caso no se observó una diferencia en cuanto a sobrevivencia, aunque cabe mencionar que en el caso del grupo al que se le suplementó con el probiótico y sin ningún anticoccidiostato (grupo E), no se observó ningún deceso durante el lapso que duró el tratamiento.

En cuanto al incremento de peso, al final del tratamiento se observa que los grupos suplementados con el probiótico presentan un peso mayor que aquellos a los cuales no se les ofreció el probiótico (Fig.8), sin embargo, al igual que O'Dea *et al.* (2006), no se presenta diferencia significativa, esta diferencia es de 200 a 400 gramos en promedio por pollo, lo cuál para cualquier productor puede significar grandes ganancias económicas, y un gran paso en la lucha contra la coccidiosis, ya que se logra superar la pérdida por enfermedad, superando la infección sin comprometer la producción mostrada como incremento en masa del pollo, aunque la ganancia de peso diario (Tabla X) fue variable debido a los factores antes mencionados (género de los pollos, variación de la temperatura, valor energético del alimento, cantidad de alimento consumido), en general se muestra una tendencia a una mayor ganancia de peso diario en los tratamientos con probiótico, mostrando una mayor producción al final del tratamiento para los grupos E, F, G y H.

En otro trabajo los grupos vacunados mostraron menor peso que los no vacunados pero siete días después del desafío el grupo vacunado desafiado mostró mayor ganancia de peso que el no vacunado desafiado pero esta ganancia fue menor que en los grupos no desafiados (Juárez *et al.*, 2007), lo cuál difiere de lo obtenido en este experimento ya que el

grupo no desafiado mostró menor ganancia de peso que los desafiados al final del tratamiento, a excepción del grupo vacunado y con antibióticos y el grupo no desafiado no tratado, a pesar de que se utilizó la misma vacuna. Además, los autores publicaron que la vacuna mostró tendencia a acelerar el tránsito del bolo alimenticio por el tracto digestivo, lo cuál coincidiría con una menor absorción del alimento y por tanto menor ganancia de peso. Sin embargo, en el grupo vacunado y provisto con probiótico hubo un mayor incremento de peso que en el vacunado sin probiótico, señalando una diferencia en la eficiencia de absorción dada por el probiótico, pero valdría la pena también realizar un estudio de tránsito de bolo alimenticio para verificar si hay algún efecto por el probiótico en este aspecto o la diferencia en la ganancia de peso se deba sólo a la mayor digestibilidad de los nutrientes dada por las enzimas producidas por el probiótico.

La edad y género pueden determinar las necesidades nutrimentales de los pollos, ya que los machos pueden requerir mayor cantidad de nutrientes que las hembras a edades similares, sin embargo, los porcentajes de la dieta no variarán en gran medida. El separar las aves por género resulta ventajoso ya que se puede controlar mejor la cantidad de alimento necesario, el peso alcanzado, y su subsecuente impacto en la fertilidad. Otra diferencia entre géneros es la cantidad de calcio requerido que para los machos es mucho menor que para las hembras (Subcommittee on Poultry Nutrition, 1994), por lo que algunas diferencias observadas en este trabajo en el peso promedio o consumo de alimento podría estar influenciada por la proporción de sexos ya que esta no se consideró en la distribución de los organismos para cada tratamiento.

VIII.5 Parámetros fisiológicos

Durante la infección de *Eimeria sp.*, la destrucción celular que ocasionan las lesiones intestinales debido a la replicación de los parásitos, puede provocar ciertos cambios en el pH del epitelio intestinal (Bradley y Radhakrishnan, 1973; Qin *et al.*, 1995). Sin embargo, en este trabajo no se observaron diferencias significativas en el pH de cada una de las porciones intestinales, lo cuál coincide con Juárez *et al.* (2007).

La bioquímica sanguínea de los pollos son un signo muy importante para diagnosticar enfermedades, por ejemplo, enfermedades hepáticas e incluso cardíacas o para detectar las deficiencias en el balance del alimento (Mitruka y Rawnsley, 1981; Lumeij and Westerhof, 1987; Bowes *et al.*, 1989; Harr, 2002).

La glucosa y el colesterol son de los principales parámetros usados para determinar el estado de salud general de un organismo (Lumeij y Westerhof, 1987). La glucosa es la principal fuente de energía para el metabolismo de las células al combinarse con el oxígeno disponible a través de la respiración, por lo que su deficiencia metabólica afecta directamente las funciones celulares. La concentración de glucosa en suero es regulada por la insulina y el glucagón, los cuales se encargan de que la glucemia en pollos se mantenga en un rango de 200 a 250 mg/dL. Normalmente, los valores de colesterol en plasma para un pollo con una dieta balanceada es de 92 a 100 mg/dL, un incremento en esta concentración se puede observar de manera normal en gallinas ponedoras durante la formación de los huevos y del vitelo, de otra manera un incremento en este valor indica una mala digestión o una carencia de absorción. El núcleo intacto de esterol proveniente del colesterol se elimina del cuerpo convirtiéndose en ácidos y sales biliares las cuales son secretadas en la bilis hacia el intestino para desecharse por heces fecales. Parte del colesterol intacto es secretado en la bilis hacia el intestino el cual es convertido por las bacterias en esteroides (Harr, 2002). Ambos parámetros se mantuvieron en un rango normal en todos los casos tratados en este trabajo, sin diferencia significativa entre ellos.

Algunas enfermedades, el uso de antibióticos, una mala alimentación, entre otros, pueden ocasionar un cierto daño hepático. Este puede ser diagnosticado hasta cierto grado por la concentración de ciertos elementos en plasma.

La aspartato aminotransferasa AST se encuentra ampliamente distribuida entre los tejidos, especialmente en el hígado, corazón, músculo esquelético, riñones y cerebro, y su incremento se ha asociado a una distrofia muscular, daño renal, envenenamiento por agentes hepatotóxicos y daño celular del hígado (Harr, 2002), cuyos valores se han reportado de 142 a 154 (Lumeij y Westerhof, 1987). Ya que los valores encontrados en este trabajo se encuentran en un rango mayor al citado, con valores de entre 200 y 700 mg/dL,

pero similar entre tratamientos, se infiere que este parámetro no es específico para determinar una enfermedad o deficiencia hepática.

En las aves los niveles de creatinina son normalmente bajos manteniéndose en un rango de 1.10 a 1.38 (Lumeij y Westerhof, 1987.). Sin embargo, se ha reportado una media de 5.23 (Mitruka y Rawnsley, 1981), el cuál está muy por encima de los encontrados en este trabajo donde se obtuvieron valores de 0.2 a 0.9, aún y cuando no se observó diferencia significativa entre los tratamientos en este aspecto, lo cuál pudiera indicar una diferencia genética pero no un efecto por los tratamientos.

La síntesis de creatinina se mantiene constante a partir de precursores musculares. Las isoenzimas de AST se producen principalmente en hígado, músculo esquelético y cardíaco (Sandoval *et al.*, 1999-2000). El mantenimiento de los valores normales de estos dos parámetros, por tanto, se obtiene a expensas de reducir el nivel productivo del pollo, logrando un menor peso muscular pero un mantenimiento regular de las actividades metabólicas normales, por lo que no se observa diferencia en los niveles de creatinina y AST en los tratamientos, pero sí se observa diferencia en la ganancia de peso.

El calcio se incrementa bajo condiciones fisiológicas normales en hembras en edad reproductiva debido al transporte de calcio unido a proteínas de la yema que van hacia al ovario por acción del estrógeno (Harr, 2002), pero durante las tres primeras semanas de edad este valor se mantiene en un rango similar para machos y hembras con una media de 15mg/dL, lo cuál se aproxima a lo observado en este trabajo donde todos las aves eran de la misma edad, observándose un rango de 7.2 a 16.4mg/dL sin diferencia significativa entre los tratamientos indicando un aporte regular de calcio en el alimento y sin variaciones debidas al género.

La lactato deshidrogenasa se puede presentar tanto en hígado como en el corazón, y la elevación de LDH en el plasma sanguíneo es signo de daño a tejido suave o enfermedad hepática, lo cuál puede ocurrir a causa de infecciones con *Histomonas meleagridis*, como se ha observado en pavos. Los músculos esquelético y cardiaco pueden ser fuentes significativas de LDH, lo cual podría reflejar una gran masa muscular o degeneración miofibrilar, e incluso un incremento en el ritmo cardiaco (Bowes *et al.*, 1989). En aves jóvenes los niveles de LDH son altos, y no hay diferencia entre géneros (Harr, 2002) con un

valor medio de 2,896mg/dL (Mitruka y Rawnsley, 1981), en este trabajo el valor máximo encontrado fue de 1,386mg/dL y una mínima de 400mg/dL. A pesar de esto no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, lo cuál implica que estos rangos menores se deben a factores genéticos ya que no se observó signo de degeneración miofibrilar, pero cabría hacer un análisis más profundo en este aspecto considerando el ritmo cardíaco de los pollos para cerciorarse de que los valores bajos de LDH en este grupo de pollos se debe a factores genéticos.

Otro parámetro considerado para rectificar la salud de las aves es la concentración plasmática de proteínas ya que la concentración de proteínas totales puede ser influenciada por la edad del ave, así como de su estado fisiológico, ambiente y exposición a agentes patógenos, con una media normal de 4.03mg/dL (Mitruka y Rawnsley, 1981). Dentro de los factores proteicos las fracciones de mayor relevancia consideradas son la bilirubina y la albúmina. No obstante, la bilirubina en pollos es mínima ya que muchas aves tienen muy poca biliverdina reductasa y por lo tanto no producen grandes cantidades de bilirubina por lo tanto, la biliverdina es el mayor pigmento en pollos, no la bilirubina debido a la ausencia de la enzima biliverdina reductasa en el hígado y en otros tejidos, por lo que los valores normales de bilirubina se encuentran en una media de 0.10mg/dL (Lumeij y Westerhof, 1987; Harr, 2002). La albúmina es sintetizada en el hígado y representa la mayor fracción proteica del plasma de las aves con una media normal de 1.92mg/dL (Mitruka y Rawnsley, 1981), bajas concentraciones están relacionadas a patologías hepáticas y renales, deficiencias nutricionales (cantidad y calidad de las proteínas dietéticas) y estados de enfermedades (Miranda-López *et al.*, 2007) y se incrementa cuando se excede la ingesta de proteínas requerida normalmente para el mantenimiento metabólico y el crecimiento (Bowes *et al.*, 1989). A pesar de que la bilirubina total presenta valores mayores a los citados con una máxima de hasta 1.1mg/dL, la concentración de proteínas totales y albúmina plasmática se encuentran en el rango reportado en la literatura.

Algunos parámetros bioquímicos son muy diferentes entre jóvenes y adultos, tal es el caso del calcio, colesterol, albúmina y proteínas totales que son menores en los jóvenes. En las primeras ocho semanas de edad se presenta un incremento en las proteínas totales, globulina y glucosa y un decremento en potasio y fósforo. El calcio, sodio, creatinina,

proteínas totales y albúmina se incrementan en las seis primeras semanas de vida mientras que el magnesio, potasio, bilirubina total y AST decrecen (Bowes *et al.*, 1989). Estas variaciones por la edad y la condición genética propia de las aves pueden ser el factor que produjo las variaciones observadas en los parámetros plasmáticos observados dentro de un mismo rango, por lo que no se encuentra diferencia significativa pero sí algunas diferencias con los valores reportados, como fue el caso para la AST, creatinina, LDH y bilirubina total.

La concentración plasmática de glucosa, colesterol, AST, creatinina, calcio, LDH, proteínas totales, bilirubina y albúmina indican que no hubo modificación en el patrón fisiológico regular de los pollos de engorda ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos alimentados con y sin probiótico y los controles.

VIII.6 Parámetros anticoccidiales

Para la aplicación de un producto profiláctico es necesario resaltar que, frente a una infección por coccidia, entre más rápido se establezca la inmunidad, menor número de ooquistes se eliminarán (Juárez *et al.*, 2007).

Debido a su capacidad de crecer en un amplio rango de pH, temperaturas y presiones osmóticas y dada su capacidad de colonizar el tracto digestivo y producir ácido láctico y péptidos antimicrobiales conocidos como pediocinas, Lee *et al.* (2007), probaron las capacidades de *Pediococcus acidilactici*, en su forma comercial MitoGrow de Imagilin Technology LLC, sobre la coccidiosis en pollos de engorda. Sus resultados fueron disímiles respecto a la especie con que infectaron a los pollos, encontrando una mayor ganancia de peso en el grupo alimentado con 0.1% del probiótico respecto al grupo infectado no tratado y aquel alimentado con 0.2% de Mito Grow, al infectarlos con *E. acervulina*. En contraste, no observaron diferencia significativa en aquellos pollos infectados con *E. tenella*, pero detectaron mayor producción de anticuerpos. No encontraron ninguna correlación entre la liberación de ooquistes y la ganancia de peso, evidenciando una protección parcial en contra de coccidiosis.

Al igual que el anterior *B. subtilis* posee amplias capacidades de sobrevivencia en diferentes ambientes pero a diferencia del anterior, la inoculación con *B. subtilis* sí mostró una reducción significativa en el número de ooquistes liberados por el grupo E, suplementado con el probiótico pero sin ningún anticoccidiostato a diferencia del grupo control I (Tabla XX) y, en general, en los grupos a los cuales se les administró el probiótico muestran una menor liberación de ooquistes con respecto a su contraparte sin probiótico, a excepción del grupo H, los cuales mostraron una mayor ganancia de peso que los grupos no tratados con probiótico (Fig.9 y Tabla IX).

A pesar de la relación entre la mayor liberación de ooquistes y la menor ganancia de peso, Kimura y colaboradores (1976) sugieren que en la infección por *E. tenella* la pérdida de peso y los signos clínicos se relacionan más con la presencia de microbiota de tipo no benéfica que con la cantidad *per se* de ooquistes eliminados en heces, ya que durante la infección por esta especie se incrementa el crecimiento de *C. perfringens* así como de *E. coli* y *Bacteroides sp.*, mientras que los niveles de *Lactobacillus* disminuyen (Bradley y Radhakrishnan, 1973). Sin embargo, se asume que la capacidad antibiótica de *Bacillus*, observada en los ensayos de competencia de las sección VII.3 de este trabajo, modula la presencia de microbiota patógena, así pues, incrementa la ganancia de peso de los pollos no solo por su mejora en la digestibilidad del alimento sino también contraponiéndose a los efectos adversos de los agentes patógenos. Por ello cabría comprobar si el incremento en peso observado en este trabajo en los tratamientos adicionados con probiótico se debió al efecto enzimático, antimicrobial o ambos, para este caso podríamos asumir que es un efecto integral y probablemente sinérgico.

El índice de lesiones (Tabla XV) concuerda con la liberación de ooquistes el día 28 (Tabla XX), donde los tratamientos que más ooquistes liberaron son también los que presentan el mayor grado promedio de lesiones, el único que no concuerda es el grupo B ya que a pesar de ocupar el cuarto lugar en cuanto a liberación de ooquistes, muestra un grado de lesiones promedio bajo, lo que indica que la vacuna pudo mitigar el daño ocasionado por las coccidias, al igual que lo encontrado por Juárez *et al.*(2007) y Li *et al.* (2005). Ahora bien, comparando el grupo E, que no recibió ninguna protección específica para coccidiosis, podemos observar que se presenta un cierto grado de protección, incluso mayor

que el que se presentó en el grupo tratado con antibióticos (tratamiento C), y mostrando una diferencia significativa ($p < 0.05$) con el grupo control I (infectado no tratado), es decir que con la simple adición de la bacteria como un probiótico potencial, se redujo el grado de lesiones significativamente aún sin adición de coccidiostato.

Se ha demostrado (Danhfoth *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2005; Juárez *et al.*, 2007) que cuando se administra un anticoccidiostato, se puede presentar una inmunidad marginal, obteniendo mayor protección hacia la infección de una especie que a la otra, lo cuál también se debe a la diferencia entre las coccidias vacunales y las obtenidas en campo con que se desafían a los pollos, esta inmunovariación ha derivado en una baja protección cruzada. Esta variación se puede observar en las diferencias en el porcentaje de liberación de ooquistes del día 28 (Tabla XX) y los porcentajes de lesiones por especie (Tabla XVI), donde, por ejemplo, la vacuna muestra un bajo porcentaje de lesiones en duodeno, porción en la que se ubica específicamente la especie *E. acervulina*, la cuál muestra el mayor porcentaje de liberación de ooquistes en este caso, mientras que para *E. maxima* y *E. tenella* se muestra una baja proporción de ooquistes y un alto grado de lesión, mayor en yeyuno (donde se ubica *E. maxima*) a pesar de que *E. tenella* es la especie más infectiva de estas tres, especializada en los ciegos, y que produce el mayor daño. El antibiótico proporciona una protección similar en cuanto a liberación de ooquistes para *E. acervulina* y *E. tenella*, pero el porcentaje de lesiones es muy similar para las tres especies, aunque la mayor protección de liberación de ooquistes se observa para *E. maxima*. En el caso del probiótico, la proporción de liberación de ooquistes es muy similar al antibiótico, con la mayor protección de lesiones en el duodeno. En general se observa que los mayores porcentajes de lesiones intestinales se observa en el yeyuno, lo cuál corresponde al daño por *E. maxima*, mientras que el mayor porcentaje de liberación de ooquistes el día 28 corresponde a *E. tenella*. Sin embargo sería necesario tomar un mayor número de muestras para poder establecer una correlación más fidedigna entre estos porcentajes.

Por razones de logística, en este trabajo no fue posible realizar los estadísticos apropiados para certificar la diferencia estadística entre los tratamientos tanto para los parámetros productivos como para los fisiológicos y de potencial anticoccidial, sin embargo, se debe tomar a consideración que para determinar rigurosamente dichas

diferencias o similitudes, como las encontradas en este trabajo, es necesario llevar a cabo un análisis estadístico apropiado de modo que se obtenga un valor que exprese en términos estadísticos los resultados obtenidos para este trabajo y similares.

VIII.7 Antibióticos

El uso de antibióticos no sólo afecta a los organismos indeseables, es decir, no sólo actúa sobre los microorganismos patógenos sino que también puede afectar a aquellos benéficos para el organismo, modificando la microbiota normal del hospedero, lo cuál puede tener repercusiones en el estado de salud y crecimiento del hospedero (Pedroso *et al.*, 2006).

La microflora intestinal de los pollos cambia normalmente respecto a la edad. Por ejemplo, *C. prefringens* aumenta según los pollos van creciendo. Sin embargo, el suplementar una dieta con antibióticos puede resultar en la modificación de la microflora intestinal de los pollos ocasionando, por ejemplo, la disminución de la población de bacterias patógenas tales como *C. perfringens*, pero también puede tener un efecto sobre otras especies no patógenas, e incluso de especies que pudiesen ser benéficas para el organismo, como es el caso de *L. salivarius*, la cuál ha sido probada por sus capacidades antimicrobianas al inhibir la colonización de patógenos tales como *Helicobacter pylori* (Ryan *et al.*, 2008) y *S. enteritidis* (Pascual *et al.*, 1999) en pollos de engorda. *L. salivarius* no fue detectada por Knarreborg *et al.* (2002), hasta el día 35, al suplementar una dieta para pollos de engorda con antibióticos. Los autores observaron por PCR-DGGE que a pesar de que por cultivo bacteriológico no encontraron presencia de *C. perfringens* en el ileon de pollos suplementados con antibióticos, encontraron por esta técnica molecular que dicho patógeno sí se encontraba presente en un número poblacional muy pequeño pero molecularmente detectable.

Los antimicrobianos se incluyen normalmente en la dieta de los pollos en bajas concentraciones y dependiendo del estado de desarrollo de las aves, con el fin de estimular el crecimiento de los pollos por efecto de la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos que se establezcan en el intestino del huésped, estimulando la colonización de

otros microorganismos que puedan ser benéficos para el desarrollo del pollo. Sin embargo, las bajas concentraciones en que se deben dosificar los antibióticos para no dañar el hígado de las aves, produce la formación de microorganismos resistentes que pueden traer serias consecuencias en la salud del ave e incluso de animales domésticos y humanos (Subcommittee on Poultry Nutrition, 1994).

Debido a los efectos adversos derivados del uso de antibióticos, el empleo de probióticos como alternativa a su empleo ha sido un tema de gran interés (Reid, 2006). *B. subtilis* puede ser un perfecto candidato para esto, ya que como se observó, mostró un mejoramiento en la calidad del pollo, ofreciendo una protección contra los efectos nocivos de la coccidia equiparable a la protección especializada de la vacuna y el antibiótico, pero sin consecuencias negativas, sino por el contrario, incrementando la producción en términos de incremento de peso.

B. subtilis no ha sido empleado, hasta ahora, como atenuador de la infección de coccidiosis, pero sí ha sido probado por sus capacidades antibióticas para la regulación de la microflora patógena de pollos. Maruta y Miyazaki (1996) probaron la capacidad de *B. subtilis* de mitigar la infección de *Salmonella* y *Campylobacter* administrando un probiótico a base de *B. subtilis* en pollos de ceba. Los autores observaron el decrecimiento en el número de *Salmonella* y *Campylobacter* en el intestino de los pollos infectados, aunado al decrecimiento en el número de *C. perfringens* y Enterobacteriaceae. Por otro lado, observaron un incremento en el número de *Lactobacillus* en la microflora intestinal de los pollos tratados. El decremento de especies patógenas y el favorecimiento de microbiota benéfica coincide con lo encontrado en este trabajo en la sección VII.3, por lo que se puede asumir que este mismo comportamiento tuvo lugar en el intestino de los pollos de engorda alimentados con la mezcla prebiótica, y esto pudo influir en el mejoramiento en el estado de salud de los pollos durante la infección, así como en el ya mencionado incremento en peso.

Además, como se observa en las Tablas XV y XXII, el uso del antibiótico no disminuyó el índice de lesiones ni de excretas a diferencia de su contraparte, el grupo G, el cuál también contaba con antibiótico pero además con probiótico, mostrando una diferencia significativa con el anterior, denotando la eficacia protectora del probiótico, haciendo factible la eliminación del antibiótico.

VIII.8 Sistema biovector de entrega

Los probióticos tienen un comportamiento dinámico, lo cual significa que dependiendo de la condición de estrés ambiental en que se encuentre, el microorganismo podrá cambiar su patrón de expresión génica que le permita adaptarse y sobrevivir al nuevo medio en que se encuentre (Britton y Versalovic, 2008).

B. subtilis es capaz de esporular y germinar en el tracto gastrointestinal, como ha sido demostrado por Tam *et al.* (2006), quienes observaron un mayor número de UFC encontradas en las heces de ratones inoculados a comparación de la dosis administrada. Ellos también encontraron una respuesta inmunológica en ratones inoculados con cepas transformadas transportando la proteína heteróloga correspondiente al fragmento C de la toxina del tétanos derivada de *Clostridium tetani*, ya sea fusionada a la proteína de cubierta de *Bacillus* CotB, sólo presente en la espora, o al fragmento *rrnO*, presente en la célula vegetativa. Gracias a la evidencia molecular que encontraron, los autores determinaron que la germinación se llevó a cabo en el yeyuno y la esporulación (encontrada por la expresión de la fusión *cotB-tetC*) ocurrió en el ileum e intestino grueso 30 a 48 horas después de la inoculación. Sus descubrimientos confirman que *B. subtilis* es capaz de germinar, proliferar y reesporular en el tracto digestivo de ratones, promoviendo una respuesta inmune eficaz debida a la expresión de la proteína heteróloga acarreada, gracias a que se ha adaptado a la vida en el tracto gastrointestinal sin colonizar de manera permanente.

La factibilidad de construir un vector de entrega de proteínas antigénicas empleando las proteínas de cubierta de la espora de *B. subtilis* es, como se ha observado en otros estudios (Isticato *et al.*, 2001; Duc *et al.*, 2003; Mauriello *et al.*, 2004), muy alta. Desafortunadamente, la extracción del DNA de coccidia fue más complicada de lo que se esperaba, imposibilitando la producción del sistema biovector acarreador de los antígenos TA4 y NA4, lo cual permanece como una posibilidad muy prometedora para el mejoramiento genético de la cepa probiótica de *B. subtilis*.

IX. CONCLUSIONES

- Se presentó por primera vez un estudio para probar las capacidades probióticas de *B. subtilis* en pollos de engorda y como tratamiento para atenuar el daño intestinal y la reducción en la ganancia de peso ocasionada por la infección por coccidia.
- *B. subtilis* posee amplias capacidades enzimáticas, representadas por su producción de enzimas tipo proteasas, carbohidrasas y lipasas, además de un amplio rango de resistencia ambiental, siendo capaz de sobrevivir y mostrarse metabólicamente activo a las condiciones presentes a lo largo del tracto gastrointestinal de pollos de engorda (*Gallus gallus*).
- La adición de *B. subtilis* a razón de 1 kg por tonelada de alimento, produjo una diferencia en la producción en biomasa de pollo de engorda biológica y económicamente importante.
- La adición de *B. subtilis* sin ayuda de coccidiostatos proporcionó una defensa a los pollos tratados mitigando el daño ocasionado por los parásitos del género *Eimeria* de manera significativa con respecto al grupo infectado no tratado.
- El tratamiento E, adicionado con probiótico sin vacuna ni antibiótico, logró un índice anticoccidial bueno, equiparable al índice obtenido en el resto de los tratamientos que contenían algún o ambos anticoccidiostatos (vacuna $\frac{1}{2}$ ionóforo).
- Este trabajo sentó un precedente para la posible supresión de antibióticos mediante la aplicación de *B. subtilis* en su calidad de probiótico mezclado con el alimento del pollo, aunque hacen falta más estudios.

X. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se recomienda repetir el experimento separando entre machos y hembras e incrementar el número de organismos y por ende el número de muestras para obtener datos más confiables en este tipo de ensayos.

Realizar un estudio de tiempo de tránsito del bolo alimenticio en pollos vacunados, vacunados y alimentados con probiótico y no vacunados alimentados con probiótico.

Comprobar si el incremento en peso se debe al efecto enzimático, antimicrobial o ambos proporcionado por el probiótico.

Aplicar un número de muestras representativas y los análisis estadísticos correspondientes.

Realizar la fusión de las proteínas antigénicas a las proteínas de cubierta de *B. subtilis* y comprobar la expresión de la proteína antigénica sobre la cubierta de la espora del bacilo.

Probar el efecto probiótico *in vivo* de la cepa de *B. subtilis* transformada, paso, germinación y esporulación en el tracto gastrointestinal del pollo, el efecto inmunoestimulador específico para coccidiosis, y la permanencia de las esporas transformadas y su viabilidad y expresión de los antígenos de coccidia.

XI. LITERATURA CITADA

- Abbas, H. T., A. Surakka, J. Apajalahti and P. E. Saris. 2007. Identification of the Most Abundant Lactobacillus Species in The Crop of 1- And 5-Week-Old Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(24): 7867–7873.
- Aguilar, C., H. Vlamakis, R. Losick and R. Kolter. 2007. Thinking About *Bacillus subtilis* as a Multicellular Organism. *Current Opinion in Microbiology*, 10(6): 638-643.
- Alfaro, D.M., A. Silva, S. Borges, F. Maiorka, S. Vargas y E. Santin. 2007. Use of *Yucca schidigera* Extract in Broiler Diets and Its Effects on Performance Results Obtained With Diferent Coccidiosis Control Methods. *Journal of Applied Poultry Research*, 16: 248-254.
- Alford, J. A., D. A. Pierce and F. G. Suggs. 1964. Activity of Microbial Lipases on Natural Fats and Synthetic Triglycerides. *Journal of Lipid Research*, 5: 390-394.
- Armas, A. y C.F. Chicco. 1969. Comparación del Maíz, Trigo, Arroz y Sorgo en Raciones Para Pollos de Engorde. *Agronomía Tropical*, 20(6): 457-462.
- Baillie, L., A. Moir y R. Manchee. 1998. The Expression of the Protective Antigen of *Bacillus Anthracis* In *Bacillus Subtilis*. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 741-746.
- Barbosa, T. M., C. R. Serra, R. M. La Ragione, M. J. Woodward and A. O. Henriques. 2005. Screening for Bacillus Isolates in the Broiler Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2): 968–978.
- Bowes, V. A., R. J. Julian and T. Stirtzinger. 1989. Comparison of Serum Biochemical Profiles of Male Broilers with Female Broilers and White Leghorn Chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 53: 7-11.
- Bradley, R. E. and C. V. Radhakrishnan. 1973. Coccidiosis in Chickens: Obligate Relationship Between *Eimeria tenella* and Certain Species of Ceca Microflora in the Pathogenesis of the Disease. *Avian Disease*, 17: 461-476.
- Brayan, P. N., M. L. Rollence, M. W. Pantoliano, J. Wood, B. C. Finzel, G. L. Gilliland, A. J. Howard and T. L. Poulos. 2004. Proteases of Enhanced Stability: Characteization Of A Thermostable Variant Of Subtilisin. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 1(4): 326 – 334.
- Breed, D.G.J., T.P.M Schetters, N.A.P. Verhoeven, A. Boot-Groenink, J. Dorrestein y A.N. Vermeulen. 1999. Vaccination Against *Eimeria tenella* Infection Using a Fraction

- of *E. tenella* Sporozoites Selected by the Capacity to Activate T cells. *International Journal for Parasitology*, 29: 1231-1240.
- Britton, R. A. and J. Versalovic. 2008. Probiotics and Gastrointestinal Infections. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2008: 1-10.
- Brusca, R.C. y Brusca G.J. 2000. *Invertebrates*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts. 2ª ed. 1004 pp.
- Castellanos, A. y M. de la L. Murguía. 1999. Evaluación de un Probiótico Para el control de *Salmonella* en Pollos de Engorda en Yucatán. *Veterinaria de México*, 30(3): 243-248.
- Chada, V. G. R., E. A. Sanstad, R. Wang and A. Driks. 2003. Morphogenesis of *Bacillus* Spore Surface. *Journal of Bacteriology*, 185(21): 6255-6261.
- Chandrasekaran, M. 1997. Industrial Enzymes From Marine Microorganisms: The Indian scenario. *Journal of Marine Biotechnology*, 5:86-89
- Chapman, H.D., T.E. Cherry, H.D. Danforth, G. Richards, M.W. Shirley y R.B. Williams. 2002. Sustainable Coccidiosis Control In Poultry Production: The Role Of Live Vaccines. *International Journal for Parasitology*, 32: 617-629.
- Dalton, J.P. y G. Mulcahy. 2001. Parasite Vaccines – a Reality? *Veterinary Parasitology*: 149-167.
- Danhfoth, H. D., E. H. Lee, A. Martin and M. Dekich. 1997. Evaluation of a Gel-Immunization Technique Used With Two Different Immucoz Vaccine Formulations In Battery and Floor-Pen Trials With Broiler Chickens. *Parasite Research*, 83: 445-451.
- Driks, A. 1999. *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1): 1-20.
- Du, A. y S. Wang. 2005. Efficacy of a DNA Vaccine Delivered in Attenuated *Salmonella typhimurium* Against *Eimeria tenella* Infection In Chickens. *International Journal for Parasitology*, 35: 777-785.
- Duc, L. H., H. A. Hong, T. M. Barbosa, A. O. Henriques and S. M. Cutting. 2004. Characterization of *Bacillus* Probiotics Available for Human Use. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4): 2161-2171.
- Duc, L., H. Hong, T. Barbosa, A. Henriques y S.M. Cutting. 2004. Characterization of *Bacillus* Probiotics Available for Human Use. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4): 2161-2171.
- Duc, L.H., H. Hong, N. Fairwather, E. Ricca y S.M. Cutting. 2003. Bacterial Spores as Vaccine Vehicles. *Infection and Immunity*, 71(5): 2810-2818.

- Ellis, J. y F. Tomley. 1991. Development of a Genetically Engineered Vaccine Against Poultry Coccidiosis. *Parasitology Today*, 7(12): 344-347
- Fajardo-Cavazos P. and W. Nicholson. 2006. Bacillus Endospores Isolated from Granite: Close Molecular Relationships to Globally Distributed Bacillus spp. From Endolithic and Extreme Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4): 2856–2863.
- Fakhry, S., I. Sorrentini, E. Ricca, M. De Felice and L. Baccigalupi. 2008. Characterization of Spore Forming Bacilli Isolated from the Human Gastrointestinal Tract. *Journal of Applied Microbiology*, 105: 2178-2186.
- FAO/WHO, 2001, paper presented at the Food and Agricultural Organization, Rome, Italy.
- Ferreira, L., R. Ferreira y W. Schumann. 2005. Bacillus subtilis As a Tool For Vaccine Development : From Antigen Factories To Delivery Vectors. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 77(1): 113-124.
- Ghosh, P.K., R.K. Saxena , R. Gupta, R.P. Yadav and S. Davidson. 1996. Microbial Lipases: Production and Applications. *Scientific Program*, 79: 119-157.
- Godfrey T, West S (1996) Introduction to Industrial Enzymology. In: Godfrey T, West S (eds) *Industrial enzymology*, 2nd edn. Macmillan Press, London, pp 1–8.
- Green, D., P. Wakeley, A. Page, A. Barnes, L. Baccigalupi, E. Ricca y S.M. Cutting. 1999. Characterization of Two *Bacillus* Probiotics. *Applied and Enviromental Microbiology*, 65(9): 4288-4291.
- Gupta, R., Q.K. Beg and P. Lorenz. 2002. Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59:15–32.
- Harr, K. E. 2002. Clinical Chemistry of Companion Avian Species: A Review. *Veterinary Clinical Pathology*, 31(3): 140-151.
- Hasan, F., A. A. Shah and A. Hameed. 2006. Industrial Applications of Microbial Lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2): 235-251.
- Hilmi, H. T. A., A. Surakka, J. Apajalahti and P. E. J. Saris. 2007. Identification of The Most Abundant *Lactobacillus* Species In The Crop Of 1- and 5-Week-Old Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(24): 7867–7873.
- Isticato, R., G. Cangiano, H. Tran, A. Ciabattini, D. Medaglini, M. Oggioni, M. De Felice, G. Pozzi y E. Ricca. 2001. Surface Display of Recombinant Proteins on Bacillus subtilis Spores. *Journal of Bacteriology*, 183(21): 6294-6301.

- Ivins, B. E., S. L. Welkos, S. F. Little, M. H. Crumrine and G. O. Nelson. 1992. Immunization Against Anthrax With *Bacillus Anthracis* Protective Antigen Combined With Adjuvants. *Infection and Immunity*, 60(2): 662-668.
- Ivins, B. y S. Welkos. 1986. Cloning and Expression of the *Bacillus anthracis* Protective Antigen Gene in *Bacillus subtilis*. *Infection and Immunity*, 54(2): 537-542.
- Jaeger, K-E. and M. T. Reetz. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 16 (9): 396-403.
- Jenkins, M. 1998. Progress on Developing a Recombinant Coccidiosis Vaccine. *International Journal for Parasitology*, 28: 1111-1119.
- Jensen, C.L., K. Stephenson, S. Jorgensen y C. Harwood. 2000. Cell-Associated Degradation Affects the Yield of Secreted Engineered and Heterologous Proteins in the *Bacillus subtilis* Expression System. *Microbiology*, 146: 2583-2594.
- Juárez, M.A., G.M. Nava y R. Merino. 2007. Efecto de Una Vacuna Anticoccidial Sobre Parámetros Fisiológicos e Inmunológicos de Pollos De Engorda. *Veterinaria México*, 38(3): 303-315.
- Kalisz, HM. 1988. Microbial proteinases. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 36:1-65.
- Kaur, S., R. M. Vohra, M. Kapoor, Q. K. Beg and G. S. Hoondal. 2001. Enhanced Production and Characterization of a Highly Thermostable Alkaline Protease From *Bacillus sp.* P-2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 125-129.
- Kimura, N., F Mimura, S. Nichida and A. Kobayashi. 1976. Studies on the Relationship Between Intestinal Flora and Cecal Coccidiosis in Chicken. *Poultry Science*, 55: 1375-1383.
- Kirk T. K. and T. W. Jeffries. 1996 . Roles for Microbial Enzymes in Pulp and Paper Processing. *Biotechnology and Food Research*. Chemical Society U.S.
- Knarreborg, A., M. A. Simon, R. M. ENgberg, B. B. Jensen and G. W. Tannock. 2002. Effects of Dietary Fat Source and Subtherapeutic Levels of Antibiotic on the Bacterial Community in the Ileum of Broiler Chickens at Various Ages. *Applied and Enviromental Microbiology*, 68(12): 5918-5924.
- Kotton, C. and E. L. Hohmann. 2004. Enteric Pathogens as Vaccine Vectors for Foreign Antigen Delivery. *Infection and Immunity*, 72(10): 5535-5547.
- Kudrya, V.A. and I.A. Simonenko. 1994. Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41:505-509.

- Kumar, C.G. and H. Takagi. 1999. Microbial Alkaline Proteases: from a Bioindustrial Viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17:561–594.
- Kumar, C.G., R.K. Malik, M.P. Tiwari. 1998. Novel Enzyme-Based Detergents: an Indian Perspective. *Current Science*, 75:1312–1318.
- Lee, K.W., S. K. Lee and B. D. Lee. 2006. *Aspergillus oryzae* as Probiotic in Poultry - A Review. *International Journal of Poultry Science* 5 (1): 01-03.
- Lee, S. H., H. S. Lillehoj, R. A. Dalloul, D. W. Park, Y. H. Hong and J. J. Lin. 2007. Influence of *Pediococcus*-Based Probiotic on Coccidiosis in Broiler Chickens. *Poultry Science*, 86: 63-66.
- Lesuisse, E., K. Schanck and C. Colson. 1993. Purification and Preliminary Characterization of the Extracellular Lipase of *Bacillus subtilis* 168, an Extremely Basic pH-Tolerant Enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 216: 155-160.
- Li, G. Q., S. Kanu, S. M. Xiao and F. Y. Xiang. 2005. Responses of Chickens Vaccinated With a Live Attenuated Multi-valent Ionophore-tolerant *Eimeria* vaccine. *Veterinary Parasitology*, 129 (3-4): 179-186.
- Lu, J., U. Idris, B. Harmon, C. Hofacre, J. J. Maurer and M. D. Lee. 2003. Diversity And Succession Of The Intestinal Bacterial Community Of The Maturing Broiler Chicken. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11): 6816–6824
- Lumeij J. T. and I. Westerhof. 1987. Blood Chemistry for the Diagnosis of Hepatobiliary Disease in Birds. A Review. *The Veterinary Quarterly*, 9(3): 255-261.
- Marco J. L., L. A. Bataus, F. F. Valeöncia, C. J. Ulhoa, S. AstolP-Filho and C. R. Felix. 1996. Purification and Characterization of a Truncated *Bacillus subtilis* α -amylase Produced by *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44(6): 746-752.
- Maruta, K and L. S. Miyazaki. 1996. Exclusion of Intestinal Patogens by Continuous Feeding with *Bacillus subtilis* C-3102 and its Influence on Intestinal Microflora in Broilers. *Animal Science and Technology*, 7: 273-280.
- Mauriello, E., L. Duc, R. Istaticato, G., Cangiano, H. Hong, M. De Felice, E. Ricca, S.M. Cutting. 2004. Display of Heterologous Antigens on the *Bacillus subtilis* Spore Coat Using cotC as a Fusion Partner. *Vaccine*, 22: 1177-1187.
- Meeusen, E. N. T., J. Walker, A. Peters, P-P. Pastoret and G. Jungersen. 2007. Current Status of Veterinary Vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3): 489-510.
- Min, W., R. Dalloul y H. Lillehoj. 2004. Application of Biotechnological Tools For Coccidia Vaccine Development. *Journal of Veterinary Science*, 5(4): 279-288.

- Miranda-López, S., H. Rincón-Reyes, R. Muñoz, A. Higuera, A. Arzálluz-Fischer y H. Urdaneta. 2007. Parámetros Productivos y Química Sanguínea en Pollos de Engorde Alimentados con Tres Niveles Dietéticos de Harina de Frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Durante la Fase de Crecimiento. *Revista Científica FCV-LUZ*, 17(2): 150-160.
- Mitruka, B. M. and H. M. Rawnsley. *Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals*. MASSON Publishing. USA. 272 pp.
- Moreno, R., F. Ibarra y P. Ochoa. 2001. Frecuencia de *Eimeria spp* en Algunas Granjas de la Zona Avícola de Tehuacán, Puebla, México. *Veterinaria México*, 32(2): 103-107.
- Mota, R. M., J. L. S. Moreira, M. R. Souza, M. F. Horta, S. MR. Teixeira, E. Neumann, J. R. Nicoli and A. C. Nunes. 2006. Genetic Transformation of Novel Isolates of Chicken *Lactobacillus* Bearing Probiotic Features for Expression of Heterologous Proteins: a Tool to Develop Live Oral Vaccines. *BMC Biotechnology*, 6(2): 1-11.
- Mountzouris, K. C., P. Tsirtsikos, E. Kalamara, S. Nitsch, G. Schatzmayr and K. Fegeros. 2007. Evaluation of the Efficacy of a Probiotic Containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* and *Pediococcus* Strains in Promoting Broiler Performance and Modulating Cecal Microflora Composition and Metabolic Activities. *Poultry Science*, 86: 309-317.
- Nagórska, K., M. Bikowski y M. Obuchowski. 2007. Multicellular Behaviour and Production of a Wide Variety of Toxic Substances Support Usage of *Bacillus subtilis* as a Powerful Biocontrol Agent. *Acta Bioquímica Polónica*, 54(3): 495-508.
- Nawani, N. and J. Kaur. 2000. Purification, Characterization and Thermostability of Lipase From a Thermophilic *Bacillus sp.* J33. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 206(1-2): 91-96.
- Nicholson, W., N. Munakata, G. Horneck, H. Melosh y P. Setlow. 2000. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3): 548-572.
- Nthangeni, M. B., H.-G. Patterson, A. van Tonder, W. P. Vergeer and D. Litthauer. 2001. Over-expression and Properties of a Purified Recombinant *Bacillus licheniformis* Lipase: a Comparative Report on *Bacillus* Lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(7-8): 705-712.
- O'Dea, E. E., G. M. Fasenko, G. E. Allison, D. R. Korver, G. W. Tannock and L. L. Guan. 2006. Investigating the Effects of Commercial Probiotics on Broiler Chick Quality and Production Efficiency. *Poultry Science*, 85: 1855-1863.

- Ochoa, J. L. 2006. Desarrollo de Probióticos para la Camaronicultura. Tesis de Doctorado. CICESE. Ensenada, Baja California. 89 pp.
- Ochoa, J. y J. Olmos. 2006. The Functional Property of *Bacillus* For Shrimp Feeds. *Food Microbiology*, 23: 519-525.
- Oggioni, M., A. Ciabattini, A. Cuppone y G. Pozzi. 2003. *Bacillus* Spores for Vaccine Delivery. *Vaccine*, 21: S2/96-S2/101.
- Olmos, J. y R. Contreras. 2003. Genetic System Constructed to Overproduce and Secrete Proinsuline in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbioloy Biotechnology*, 62: 396-373.
- Outtrup, H. and C.O. Boyce. 1990. Microbial Proteinases and Biotechnology. In: Fogarty CT, Kelly K. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Elsevier, London: 227–254.
- Pandey, A., S. Benjamin, C. R. Soccol, P. Nigam, N. Krieger and V. T. Soccol. 1999. The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29: 119–131.
- Pascual, M., M. Hugas, J. I. Badiola, J. M. Monfort and M. Garriga. 1999. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 Prevents *Salmonella enteritidis* Colonization in Chickens. *Applied and Enviromental Microbiology*, 65(11): 4981-4986.
- Pedroso, A. A., J. F. M. Menten, M. R. Lambais, A. M. C. Racanicci, F: A: Longo and J. O. B. Sorbara. 2006. Intestinal Bacterial Community and Growth Performance of Chickens Fed Diets Containing Antibiotics. *Poultry Science*, 85: 747-752.
- Pinchuk, I. V., P. Bressollier, B. Verneuil, B. Fenet, I. B. Sorokulova, F. Mégraud and M. C. Urdaci. 2001. In Vitro Anti-*Helicobacter pylori* Activity of the Probiotic Strain *Bacillus subtilis* 3 is Due to Secretion of Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(11): 3156-3161.
- Pinheiro, D. F., V. C. Cruz, J. R. Sartori and M. L. M. Vicentini Paulino. 2004. Effect of Early Feed Restriction and Enzyme Supplementation on Digestive Enzyme Activities in Broilers. *Poultry Science*, 83: 1544–1550.
- Pogonka, T., C. Klotz, F. Kovács y R. Lucius. 2003. A single dose of recombinant *Salmonella typhimurium* Induces Specific Humoral Responses Against Heterologous *Eimeria tenella* Antigens In Chicken. *International Journal for Parasitology*, 33: 81-88.
- Qin, Z. R., T. Fukata, E. Baba and A. Arakawa. 1995. A Effect of Lactose and *Lactobacillus acidophilus* on the Colonization of *Salmonella enteritidis* in Chicks Concurrently infected with *Eimeria tenella*. *Avian Diseases*, 39: 548-553.

- Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge and V. V. Deshpande. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 597-635.
- Reid, G. 2006. Probiotics to Prevent the Need for, and Augment the Use of, Antibiotics. *Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, 17(5): 291-294.
- Rengpipat, S., W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul y P. Menasveta. 1998. Effects of a Probiotic Bacterium on Black Tigre Shrimp *Penaeus monodon* Survival and Growth. *Aquaculture*, 167: 301-313.
- Ruiz, C., F. I. J. Pastor and P. Diaz. 2003. Isolation and Characterization of *Bacillus* Sp. BP-6 Lipa, a Ubiquitous Lipase among Mesophilic *Bacillus* Species. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 354-359.
- Ryan, K. A., P. Daly, Y. Li, C. Hooton and P. W. O'Toole. 2008. Strain-specific Inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus salivarius* and Other Lactobacilli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61: 831-834.
- Salinas, M., E. Icochea, E. Casas, N., Falcón y P. Reyna. 2001. Niveles de Ooquistes de *Eimeria* en Cama y su Relación con las Lesiones Intestinales en Pollos Broiler. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12(1): 1-5.
- Sandoval, G.L., F.A. Revidatti, J.C. Terraes, R.J. Fernandez and P. Esquivel de Luchi. 1999-2000. Efectos del Estrés Sobre el Peso y Parámetros Bioquímicos de Pollos Parrilleros con y sin Tratamiento Lipotrópico Continuo. *Revista Veterinaria*, 10/11(1 y 2): 25-29.
- Sasai, K. 1998. The Role of the Apical Complex in Host Cell Invasion by Coccidia. *Parasitology International*.
- Schallmeyer, M., A. Singh and O. P. Ward. 2004. Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1): 1-17.
- Silversides, G., and M. R. Bedford. 1999. Effect of Pelleting Temperature on the Recovery and Efficacy of a Xylanase Enzyme in Wheat-Based Diets Poultry. *Science*, 78: 1184-1190.
- Smith, N. 1998. Progress Towards a Vaccine Against Poultry Coccidiosis: the Potential Harnessing of Maternal Immunity. *Parasitology International*.
- Steinmetz, M., D Le Coq, S. Aymerich, G. Gonzy-Tr~boul and P. Gay. 1985. The DNA Sequence of the Gene For the Secreted *Bacillus subtilis* Enzyme Levansucrase and Its Genetic Control Sites. *Molecular and General Genetics*, 200:220-228.

- Subcommittee on Poultry Nutrition, Committee on Animal Nutrition Board on Agriculture, National Research Council. 1994. Nutrient Requirements of Poultry. National Academy Press. Ninth Revised Edition. Washington , D.C. 157 pp.
- Suo, X., J.X. Zhang, Z.G. Li, C.T. Yang, Q.R. Min, L.T. Xu, Q. Liu y X.Q. Zhu. 2006. The Efficacy and Economic Benefits of Supercox, A Live Anticoccidial Vaccine In A Commercial Trial In Broiler Chickens In China. *Veterinary Parasitology*, 142: 63-70.
- Tam, N. K., N. Q. Uyen, H. A. Hong, L. H. Duc, T. T. Hoa, C. S. Serra, A. O. Henriques and S. M. Cutting. 2006. The Intestinal Life Cycle of *Bacillus subtilis* and Close Relatives. *Journal of Bacteriology*, 188(7): 2692-2700.
- Tamasaukas, R., H. Ruiz, W. Theis y V. de Basilio, 1996. Evaluación de la Eficacia del Salstop y Del Digestor Broilers (Citrade C.A.): Productos Derivados de Extractos de Semillas de Frutas Cítricas Contra la Coccidiosis Aviar: Prueba en Piso. *Parasitología al Día*, 20 (3-4):118-124.
- Teo, Alex Yeow-Lim and Hai-Meng Tan. 2005. Inhibition of *Clostridium perfringens* by a Novel Strain of *Bacillus subtilis* Isolated from the Gastrointestinal Tracts of Healthy Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8): 4185-4190.
- Tinh, N.T.N., K. Dierckens, P. Sorgeloos y P. Bossier. 2007. A Review of the Functionality of Probiotics in the Larviculture Food Chain. *Marine Biotechnology*, 10: 1-12.
- Tomley, F., A. Smith y M. Shirley. 1998. Strategies for Novel Control Programmes Via Vaccination in Coccidia. *Parasitology International*.
- Tovar, M. 2002. Situación Actual En La Prevención De La Coccidiosis Y Perspectivas De Futuro. *Selecciones Avícolas*.
- Underkofler, L. A., R. R. Barton and S. S. Rennert. 1956. Microbiological Process Report Production of Microbial Enzymes and Their Applications. Presented at Symposium, Society for Industrial Microbiology, Storrs, Connecticut: 212-221.
- Vermeulen, A.N. 1998. Progress in Recombinant Vaccine Development Against Coccidiosis. A Review and Prospects Into The Next Millennium. *International Journal for Parasitology*, 28: 1121-1130.
- Vermeulen, A.N., D.C. Schaap y Th.P.M. Schetters. 2001. *Veterinary Parasitology*, 100: 13-20.
- Vieira de Carvalho, R., T. L. Ribeiro Côrrea, J. C. Matos da Silva, L. R. Coutinho de Oliveira Mansur, M. L. Leal Martins. 2008. Properties of an Amylase From Thermophilic *Bacillus Sp*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39:102-107

- Wang, Y-B. 2007. Effect of Probiotics on Growth Performance and Digestive Enzyme Activity of The Shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269: 259-264.
- Watts, A. M. and R. C. Kennedy. DNA Vaccination Strategies Against Infectious Diseases. *International Journal of Parasitology*, 29: 1149-1163.
- Williams, R.B. 1999. A Compartmentalised Model for the Estimation of the Cost of Coccidiosis to the World'S Chicken Production Industry. *International Journal of Parasitology*, 29: 1209-1229.
- Zamost, B. L., H. K. Nielsen and R. L. Starnes. 1991. Thermostable Enzymes for Industrial Applications. *Journal of Industrial Microbiology*, 8: 71-82.
- Zanella, I., N. K. Sakomura, F. G. Silversides, A. Figueirido and M. Pack. 1999. Effect of Enzyme Supplementation of Broiler Diets Based on Corn and Soybeans. *Poultry Science*, 78: 561–568.
- Zhou, A. A., Z. Jiang, D. Lv and T. Wang. 2009. Improved energy-utilizing efficiency by enzyme preparation supplement in broiler diets with different metabolizable energy levels. *Poultry Science*, 88: 316–322.

<http://bacillus.genome.jp/> (22 Mayo 2008)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (22 Mayo 2008)

<http://www.una.org.mx> (13 Agosto 2009)

http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=61&Itemid=84
(13 Agosto 2009)

http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=65&Itemid=88
(13 Agosto 2009)

http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=64&Itemid=87
(13 Agosto 2009)

http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=60&Itemid=83
(13 Agosto 2009)

http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=74&Itemid=97
(13 Agosto 2009)

http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=73&Itemid=96
(13 Agosto 2009)