

## ARTICULO RESEÑA

**Empleo de probióticos a base de *Bacillus sp* y sus endosporas en la producción avícola.**

**Grethel Milián Florido<sup>1</sup>, Manuel Pérez Quintana<sup>1</sup>, Yenisleidys Puentes Martiatus<sup>1</sup> y Ramón Bocourt Salabarría<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup> **Universidad de Matanzas” Camilo Cienfuegos”. Apartado Postal , Km 3 ½, Autopista Varadero, Matanzas.**

<sup>2</sup> **Instituto de Ciencia Animal. Apartado Postal 24. San José de las Lajas, La Habana.**

### RESUMEN

Se hace una revisión sobre el empleo de probióticos a base de cepas de *Bacillus sp.* y sus endosporas. Se define el concepto de probiótico y su evolución a partir de los trabajos de Metchnikoff (1908). Se señalan las características morfológicas y bioquímicas de los cultivos de *Bacillus sp* y sus endosporas y se destacan los principales efectos de estos sobre indicadores inmunológicos, fisiológicos y productivos en aves. Finalmente, se muestran los principales resultados del empleo, como probiótico, de estos cultivos en la avicultura.

**Palabras claves:** *Bacillus sp*, endosporas, probióticos, aves.

### INTRODUCCIÓN

Debido a los métodos de manejo intensivos actuales, los animales de granja, fundamentalmente las aves, son muy susceptibles a desbalances bacterianos entéricos que llevan a una insuficiente conversión de los alimentos y a una disminución en la respuesta zootécnica. Para atenuar estas dificultades, las dietas son suplementadas con antibióticos, los cuales han mostrado ser efectivos en la disminución de los trastornos diarreicos y en la promoción del crecimiento animal (Armstrong, 1986; Parker y Armstrong, 1987), sin embargo, el uso indiscriminado

de los mismos ha llevado a la aparición de cepas patógenas resistentes. Hoy preocupa el riesgo potencial, por el uso de los antibióticos en los animales productores de alimento y su eventual contribución a que favorecen el desarrollo de enteropatógenos en el tracto intestinal, que pueden conducir a serias implicaciones médicas (Levis, 1998; Christina y Surawicz 2003 y Günter, 2003).

Como una solución a la necesaria reducción del uso de los antibióticos en el alimento animal para promover el crecimiento, ha despertado renovado interés la incorporación de cultivos de bacterias probióticas como aditivos promotores de la respuesta productiva en animales (Nisbet, 2002; Philippe, 2003 y La Ragione et al., 2004).

En tal sentido algunos cultivos del género *Bacillus* y sus endosporas, están recibiendo marcada atención por el efecto probiótico que brindan sobre el balance de la microflora intestinal, la mejora en la digestión y la absorción de los alimentos, la mayor eficacia en la conversión alimenticia y los mejores rendimientos productivos, principalmente, en aves (Inooka et al 1986; Guillot 2000 y Spinosa et al 2000; La Ragione et al., 2001 y Jadamus et al, 2001 y Duc le H et al 2003).

El objetivo del presente trabajo es hacer una revisión sobre el empleo de probióticos a base de cepas de *Bacillus sp* y sus endosporas como mejoradores del sistema inmunológico, la fisiología digestiva y la respuesta productiva en las aves.

## DESARROLLO

### ¿Qué son los probióticos?

La fundamentación del uso de probióticos se remonta a principios del siglo XX cuando Metchnikoff (1908) planteó que la ingestión de bacterias ácido lácticas podían tener efectos beneficiosos sobre la flora intestinal, atribuyendo estos, fundamentalmente, a los cultivos presentes en el yogur.

Este concepto fue evolucionando con el transcurso del tiempo, siendo Lilley y Stillwell (1965), quienes introdujeron el término probiótico y lo definieron como

sustancias producidas por un microorganismo que favorece el crecimiento y desarrollo de otros. Parker (1974) estando al tanto de la anterior definición dijo que los probióticos eran organismos y sustancias que contribuían a un favorable equilibrio microbiano en el sistema digestivo.

Fuller (1986) y Sainsbury (1992,1993) describieron a los probióticos como suplementos alimentarios para animales, con un efecto protector sobre la flora indígena del intestino y la eliminación de microorganismos patógenos, constituidos, principalmente, por cultivos de bacterias ácido lácticas, *Bacillus* y levaduras. Este mismo autor (1989) y Guillot (2000) argumentaron que los probióticos son microorganismos vivos suministrados a través de la ruta digestiva favorecen la salud del hospedero.

Gunther (1995) clasifica a los probióticos como aditivos alimentarios microbianos, pero incluye en su clasificación a organismos microbianos viables y no viables de las especies *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* y *Bacillus*, productos de la fermentación microbiana, nucleótidos, y sus productos metabolizables, metabolitos de las proteínas y sustancias derivadas, ácidos orgánicos tales como el láctico, cítrico, acético, fumárico y otros, así como enzimas, principalmente de tipo hidrolíticas.

Según Lyons (1997) los probióticos son productos naturales, que utilizados como promotores del crecimiento en los animales permiten obtener mayores rendimientos, más elevada resistencia inmunológica y reducida o ninguna cantidad de patógenos en el TGI.

Una definición más actual considera que los probióticos son bacterias residentes que forman colonias en el tracto gastrointestinal, vaginal y en la boca. Estas bacterias representadas por *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaris*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* y otros microorganismos beneficiosos, son la primera línea de defensa del cuerpo contra los microorganismos potencialmente dañinos que se inhalan o se ingieren. Estas bacterias probióticas son consideradas como los guardianes del cuerpo por ser residentes del mismo y ayudar a prevenir una amplia gama de enfermedades (Lori Kopp-Hoolihan 2001 y Monteleone et al 2002).

Los probióticos son considerados como sustancias de carácter aditivo a las dietas, incluso los antibióticos producidos por los propios microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal se incluyen entre las sustancias probióticas. Sin embargo, el concepto de aditivo biológico no parece tampoco reflejar con exactitud cuanto de específico y diferencial tiene este grupo de microorganismos, cuyos efectos enzimáticos son muy distintos de los que corresponden a su acción antagónica microbiana. Se ha estado recomendando que los microorganismos susceptibles de emplearse como aditivos fueran especies o cepas vivas de microorganismos capaces de adherirse a las células epiteliales y multiplicarse seguidamente. Sin embargo, cepas de otras bacterias como el *Bacillus cereus*, a pesar de no adherirse al epitelio intestinal han sido eficaces como probióticos. Su capacidad no depende de adherirse sino de colonizar el tracto gastro intestinal, por lo que su suministro debe ser periódico para que circule a lo largo de todo el tracto intestinal bajo una forma viva y activa (Hoa et al. 2000 y Duc et al., 2003).

Se ha definido, también, que un probiótico corresponde a la preparación de un producto que contiene microorganismos viables en suficiente número que altere la microflora por implantación o colonización, mejorando el comportamiento del huésped y provocando efectos beneficiosos sobre la salud del mismo. Esta definición hace hincapié en la presencia de microorganismos viables, en número suficiente para provocar los efectos beneficiosos sobre la salud, a través de una alteración positiva de la microflora por colonización del intestino (Jadamus et al. 2001 y Casula and Cutting , 2002).

Hasta el momento de nacer, el aparato digestivo del feto en mamíferos o del embrión en aves es estéril. La colonización microbiana, sin embargo, es extremadamente rápida y alcanza cifras próximas a los  $10^{10}$  microorganismos por gramo de heces a partir de las 48 horas después del nacimiento. Un 20 % de esta biomasa microbiana permanece sin identificar, y aun cuando las bacterias están representadas fundamentalmente por enterobacterias y anaerobios (facultativos y estrictos) sus variaciones entre especies animales son muy amplias. Así, por ejemplo, el intestino de los gazapos carece de lactobacilos en las primeras semanas de edad.

En todo caso, cualquiera que sea el animal, la luz intestinal va a colonizarse por la flora ambiental y de la propia madre. Antes de los 7 días de vida se puede considerar que la colonización y el estándar microbiano intestinal quedan establecidos y diferenciados en un alto por ciento. De ahí la importancia que reviste el suministro a los animales de productos biológicos tales como los probióticos (Garlich,1999).

### **Acción de los probióticos a nivel de tracto gastrointestinal (TGI)**

Cada vez es mayor el uso de los probióticos en la avicultura intensiva. La razón de esto hay que buscarla en la amplia diversidad de ventajas que ofrece su uso. Se plantea que la introducción de un probiótico es un evento natural el cual actuará beneficiando las interacciones naturales y complejas de la flora intestinal. Sus efectos positivos no solo serán a nivel del TGI, además se reflejarán en resultados zootécnicos tales como ganancia de peso vivo y conversión alimenticia (Prast, 1999).

Los probióticos están encaminados a favorecer la microflora intestinal, la cual está compuesta, en su gran mayoría, por bacterias ácido láctica. Esta microflora es esencial para descomponer las sustancias alimenticias que no fueron digeridas previamente, mantener la integridad de la mucosa intestinal protegiendo así a todas sus paredes, al desdoblar los alimentos producen vitaminas (sobre todo del complejo hidrosoluble) y ácidos grasos, reduce el nivel de colesterol y triglicéridos en sangre, al mantener la estabilidad intestinal logran aumentar la respuesta inmune; se conoce que cuando estos mecanismos son agredidos por algún agente externo es el momento idóneo para entrar a actuar los probióticos. No basta la solo acción de los mismos sino que hay que crearles a las aves un estado ambiental general adecuado y dietas que suministren los nutrientes necesarios (Pratt et al 2002 y Smolander et al 2004).

### **Microbiología del tracto intestinal de las aves**

Normalmente, las bacterias que habitan en el tracto digestivo no solo son beneficiosas, sino también esenciales. En las aves, las bacterias crecen activamente en el buche, intestinos y ciegos. Entre las aves silvestres, los recién nacidos obtienen sus primeras bacterias de la boca, buche o excremento de la madre. Por consiguiente, una población deseable, equilibrada, o beneficiosa de bacterias se establece rápidamente en el ave joven. Los polluelos que nacen en plantas incubadoras comerciales no tienen esta oportunidad. Estos problemas se puede resolver proporcionando cultivos vivos de bacterias beneficiosas (probióticos) al momento de la eclosión. Una población bacteriana beneficiosa inhibe bacterias potencialmente patogénicas, estimula el sistema inmunológico, produce nutrientes que ayudan a nutrir las células que recubren el tracto digestivo, reduce la producción de amoníaco y las cantidades tóxicas de aminas biogénicas (Garlich, 1999).

Moreno (2003), plantea que son muchas las bacterias y las levaduras que se pueden usar de forma beneficiosa para mantener una flora digestiva sana y en equilibrio. Los microorganismos mas usados son *Lactobacillus sp.*, *Sreptococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophyllus* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Los *Lactobacillus*, que crecen rápidamente en el intestino, son quizás los más conocidos por los avicultores, se trata de bacterias que pueden transformar la lactosa en ácido láctico. Este aumento de ácido láctico hace disminuir el pH intestinal a unos niveles tan bajos que la supervivencia de microorganismos como la *E.coli*, *Salmonellas* entre otros, se hace muy difícil. Las levaduras también forman parte de los probióticos, son utilizados por su poder fermentativo y por su riqueza en vitaminas del grupo B y enzimas hidrolíticas que ayudan al proceso de digestión.(Moreno,2003).

Walter y Henry (1988) plantearon que *Bacillus*, podían ser usados como probióticos pero de forma repetitiva en el alimento para prevenir los desórdenes digestivos y/o mejorar el desarrollo zootécnico.

### **Características microbiológicas del *Bacillus sp.***

Las bacterias del género *Bacillus* microbiológicamente son consideradas como Gram positivas en forma de bastoncillo, agrupadas en cadenas, mótilas y flagelación peritrica, formadoras de endosporas, anaerobias estrictas o facultativas, no son adherentes, y son productoras de sustancias antimicrobianas y enzimas hidrolasas. Entre las especies de mayor importancia como probióticos pertenecientes a este género están *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. natto*.(Jawets,1996).

La producción de endosporas es una característica típica de todas las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. Estas son pequeñas estructuras ovoides o esféricas, en las que pueden transformarse estas bacterias y constituyen formas celulares muy resistentes al calor y al medio adverso. Su síntesis se produce frente a condiciones de limitación de nutrientes, agua y oxígeno y constituye un sistema de protección frente a las condiciones ambientales adversas. En su composición química entran el ácido dipicolínico (ADP) y los iones Calcio, que asociados al córtex, forman el dipicolinato de Calcio, responsable de la resistencia al calor( Stanier,1996).

La estructura de las endosporas es compleja y posee varias capas que, del exterior al interior, pueden nombrarse como: exosporio (cubierta fina y muy delicada), cutícula (con una o varias capas de material similar al de la pared celular) y córtex (compuesta por varios anillos concéntricos, constituido por glucopéptidos y contenedor de las estructuras normales de la célula).(Stanier, 1996).

Otros de los elementos que caracteriza a los *Bacillus sp* es la producción de enzimas hidrolíticas que ayudan a mejorar la utilización de los alimentos. Dentro de estas se encuentran las proteasas, amilasas y las glicosidasas que descomponen las complejas moléculas de los alimentos y las transforman en nutrientes más simples. Estos compuestos son absorbidos más rápidamente por

el animal o pueden ser empleados por otras bacterias beneficiosas para el establecimiento de una microflora intestinal balanceada. El empleo de las bacterias del género *Bacillus* y sus endosporas también viene dado por su capacidad de producción de enzimas, estas además de mejorar la digestión en el hospedero, son capaces de inhibir el crecimiento microbiano de bacterias dañinas. Las endosporas, por su parte, estimulan el sistema inmune contribuyendo a la resistencia contra el desafío de patógenos ambientales. Anon (1998).

Bortolozzo (2002) informa que dentro de los *Bacillus* mas utilizados como probióticos se encuentra el *Bacillus subtilis*, a pesar de estar considerados como microorganismo transitorio del TGI, pues no poseen la capacidad de adherirse al epitelio intestinal, su efecto esta encaminado a multiplicar y favorecer la colonización de otros microorganismos como es el caso del *Lactobacillus acidophylus*.

Gabriel (1999) atribuye que una de las funciones más importante de los *Bacillus* y sus endosporas es el fortalecimiento del sistema inmune en las aves. Los mismos pueden actuar en la inmunología específica y en la protección inespecífica de las parvadas. Piad (2002) también plantea que una de las acciones fundamentales de los probióticos a base de *Bacillus* y sus endosporas es activando el sistema inmune en las aves.

### **Efectos beneficiosos del uso de los *Bacillus* y sus endosporas como probióticos en aves.**

Según Ross Tech (1999) las esporas de *Bacillus* unidas a otras especies de bacterias tales como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*, contribuyen a disminuir la acidez del intestino, favoreciendo los procesos digestivos y el control del crecimiento de Enterobacteriaceae en aves.

Dentro de la actividad enzimática específica de algunas especies de *Bacillus* se citan:

Se produce proteasa, amilasa,  $\beta$ -glucanasa y otras enzimas por *Bacillus subtilis*, produce proteasa, amilasa y otras enzimas el *Bacillus licheniformis* y produce  $\beta$ -

glucanasa la especie de *Bacillus circulans*.

El empleo de endosporas de *Bacillus sp* puede contribuir a una disminución de acidez del intestino en las aves, favoreciendo el crecimiento de *Lactobacillus* en el TGI, estimulando el sistema inmune, contribuyendo a la resistencia contra el desafío de patógenos ambientales, Inhibiendo y controlando el crecimiento microbiano de bacterias dañinas y favorecen los procesos digestivos del (Anon, 1998).

Las endosporas de *Bacillus subtilis* que generalmente, permanecen viables en el alimento suministrado a aves son estables en la acidez gástrica, actúan contra patógenos específicos en el intestino e incrementan los *Lactobacillus* del tubo intestinal (Jiraphocakul et al, 1990).

#### **Algunos resultados en la producción avícola de empleo de probióticos a base de *Bacillus sp* y sus endosporas.**

Maruta et al (1996) administraron a pollos de ceba un probiótico a base de *Bacillus subtilis* (C-3102) para evaluar la exclusión o decrecimiento de patógenos intestinales tales como *Salmonella* o *Campylobacter*. Los resultados mostraron un decrecimiento en el número y rango de detención de *Campylobacter* y *Salmonella* en los grupos desafiados, con respecto al control para ambas entidades infecciosas ( $P < 0.01$ ). Asimismo, fueron observados decrecimiento en el número de *Clostridium perfringens* y Enterobacteriaceae. Por otro lado se observó un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en el número de *Lactobacillus* al investigarse la microflora intestinal. Estos resultados demostraron la eficacia de este cultivo.

Shubert et al (1999) estudiaron el efecto de una cepa de *Bacillus cereus* en pollos de ceba. Encontraron una inhibición de bacterias indeseables en el intestino. Además comprobaron un menor peso relativo de los órganos digestivos, asociado esto con un mayor rendimiento en las aves. Estos mismos autores en otra investigación estudiaron el uso de un probiótico a base de *Bacillus cereus* (Toyocerin) en pollos de ceba. Suministran 50 y 100 mg/kg en la dieta y

comprobaron que el peso final era superior en 1.5% y 2.1%, en los animales tratados, respecto al control. Asimismo, mejoró la conversión pen 1.2% y 2%. La mortalidad fue disminuida a 2.7% y 4.5%, con respecto al grupo control.

Jiraphocakul et al (1999) informaron que esporas viables de *Bacillus subtilis* en el alimento son estables la acidez gástrica y actúan contra patógenos específicos en el intestino tales como *E. coli*. Su empleo incrementó los conteos de *Lactobacillus* en el intestino con un efecto promotor del crecimiento.

Guillot (2000) plantea que entre las especies microbianas con probióticos en animales se encuentran las bacterias del género *Bacillus*. Cita como especies de mayor importancia a: *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. subtilis*. Una de las principales acciones probióticas de estas bacterias es la producción de enzimas que mejoran la función digestiva en las aves. En otro experimento informado por este autor estudio el efecto de esporas de *Bacillus* en aves desafiadas con *E. tenella* y *Salmonella sp.* Se observó una reducción de los síntomas clínicos ligados con un mejor crecimiento. Así mismo este autor estudio que la administración en pollos de ceba de la cepa C-3102 de *Bacillus subtilis* puede excluir o decrecer la presencia de patógenos intestinales tales como *Salmonella* y *Campylobacter*. Este resultado mostró un decrecimiento en el número y rango de detección de estas especies.

Endo y Nakano (2000) estudiaron los efectos del empleo de un probiótico en pollos de ceba el cual incluía especies de *Lactobacilos*, *Bacilos*, *Streptococos* y *Saccharomyces* en una dosis de 3 g/kg de concentrado. El probiótico decreció el número de Enterobacteraceae (*E.coli* y *Salmonella*) en el ciego.

Estudios realizados por Maruta (1993) e informados también por Bortolozo (2002) quienes administraron un probiótico a base de *Bacillus subtilis* a pollos de ceba, muestran un aumento de la musculatura y disminución de la grasa abdominal, principalmente en machos. Además observaron que el suministro de este probiótico disminuyó el por ciento de bacterias patógenas, fundamentalmente, *Salmonella* desde un 60 a un 20 %. Estos mismos autores cuando aplicaron un probiótico a base de *Bacillus natto* sobre la microflora intestinal en pollos de ceba, a razón de 0,50, 75 y 100 g de probiótico ( $10^9$  *Bacillus natto/g*) por tonelada de

ración, observaron una disminución del número de coliformes fecales en relación con los controles, sugirieron el empleo de una dosis de 100 g de este probiótico por cada tonelada de concentrado.

Colin et al (1994) estudiaron el efecto del empleo de dos probióticos (esporas de *Bacillus ssp* a razón de 100 ppm con  $10^{10}$  ufc/g y una mezcla de microorganismos lácticos, levaduras y enzimas digestivas a razón de 100 ppm en dietas de pollos de engorde, además del antibiótico licomicina un control positivo. Encontraron una mejora en la ganancia de peso. La acción de los dos probióticos no difirió entre si, pero si con el antibiótico y el grupo control.

Nakano et al (1999) y Alarcon (2001).comprobaron que al suministrar una mezcla probiótica (*Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus* y *Saccharomyces*) se reducía significativamente el nivel de colesterol sérico y hepático en gallos alimentados con dietas enriquecidas con colesterol. Las *Enterobacteriaceae* fueron también significativamente reducidas. El pH, por su parte, no se altero, en tanto se incrementaron la concentración de AGCC en los ciegos de los animales tratados.

Arturo et al (2000) evaluaron el efecto del *Bacillus toyoi* adicionado a la dieta de polllos de engorde, demostrando tener un efecto promotor del crecimiento y disminución de la mortalidad por *Salmonella*.

Hansen (2004), obtuvo un probiótico compuesto por esporas de *Bacillus licheniformis* y *subtilis*. Demostrando que las enzimas que producen estas cepas como: amilasas, proteasas, lipasas contribuyen a mejorar la digestión de los ingredientes del pienso , hecho que se refleja en claras mejoras en los parámetros productivos. Además inhibe el crecimiento de agentes patógenos (*Clostridium perfringens*, *Staphylococcus*, bacterias coniformes) y estimulan la respuesta inmunitaria. En terneros se ha demostrado que el uso de este probiótico ha demostrado una ganancia media diaria y los índices de conversión , además de disminuir la presencia de diarreas.

## **CONSIDERACIONES FINALES**

El empleo de probióticos a base de *Bacillus sp* y sus endosporas, en la aves, está

encaminado a mejorar el balance microbiano en del TGI, inhibir el crecimiento de bacterias dañinas, producir enzimas hidrolíticas para mejorar la utilización de los alimentos, e incrementar los contenidos de bacterias ácido lácticas en el TGI, favoreciendo la acidez del intestino. Así mismo los cultivos de *Bacillus* sp y sus endosporas estimulan la respuesta inmunológica favoreciendo la diferenciación de células supresoras o estimuladoras y como resultado final mejorar los rendimientos productivos.

## REFERENCIAS

- Alarcón, Teresa. 2001. *B. subtilis* 3 contra *H. pylori*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2001 (Nov); 45: 3156-3161
- Andrews, A. 1992. Probiotics and other prophylactic agents. Ocasional publication. No. British Society of Animal Production
- Anon 2000. Antibióticos y otros promotores del crecimiento en la avicultura. *Industria avícola*. Julio: 14-18
- Anon. 1998. CHR. Hansel. Byo System. The World's microbial experts. Probio:www. Chrhansen.com. Infocarne.probióticos en nutrición animal.com(2001)
- Anon.1998. Residues and reassurance. *International Pig Topic*. 13:1-10
- Armstrong, D.G. 1986. Gut active growth promoters. En: *Control and manipulation of animal growth*. Editado por P. J. Buttery, D. Lindsay y N: B: Haymes Butterworth, London, pp 21-37
- Bortolozzo, F., F y Kira, K. K.2002. Probióticos . Uso de los probióticos na alimentacioo de frangos de corte. [File://A:/](#) probióticos 10. Htm.pp:1-
- Carla, M.y Chistrian, J.2002.Probióticos. Estudios realizados en el laboratorio y consultoría:Tres Arroyos (ACTA)
- Casula G y Cutting S. M. 2002. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Applied Environ. Microbial* May 68(5): 2344-2350

Christina M. y Surawicz M.D. 2003. **Probiotics-antibiotic associated** diarrhoea and Clostridium difficile diarrhoea in humans Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. Volume 17, Issue 5 , October 2003, Pages 775-783

COLIN, I.; Morales, E y Avila, E.1994. Evaluación de promotores del crecimiento para pollos de engorde. Veterinaria. México. 25(2):141-144

Duc le H.; Hong H.A y Cutting S.M. 2003. Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery: Vaccine. Oct. 1: 21 27-30: 4215-24

Duc le H.; Hong HA.; Cutting SM. 2003. Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery. Vaccine Oct. 1 (27-30): 4215-4224

E. V. Pratt, S. P.; Ros.; and A. A. Keeling. 2002. Effect of ambient **temperature** on losses of volatile nitrogen compounds from stored laying hen manure. Bioresources Technology. Volume 84, Issue 2, September: 203-205

Fuller, R.1986. Probiotics. J.Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.15-75

Fuller,R.1989. Probiotics in man and animal.J.Appl. Bacterial. 66:365

Guillot, J. F.2000. The pros and cons of probiotics. Make probiotics work for poultry. World Poultry 16 (7):18-21

**Günter K. 2003.** Taxonomy, ecology and resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**

Volume 88, Issues 2-3 , 1 December 2003, Pages 123-131

Gunther, K. 1995. The role of probiotic as feed additives in animal nutrition. Department of animal physiology and animal nutrition. Gottingem, Germany

Hoang NT.; Baccigalupi L.; Huxham A.; Smertenko A.; Van PH.; Ammendola S.; Ricca E.; Cutting AS. 2000. Characterization of Bacillus species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. Applied Environ. Microbiol.Dec., 66 (12): 5241-5247

<http://. Arcosbalnco.com>.2003

Inooka S.; Uehara S.; Kimura M.; 1986. The effect of Bacillus natto on the T and B lymphocytes from spleens of feeding chickens. Poult Sci

- Jadamus A, Vahjen W, Simon O. 2001. Growth behaviour of spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. Arch Tierernahr. 1;54 (1): 1-17
- Jadamus A.; Vahjen W.; Simon O. 2001. Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. Arch.Tierernahr. 2000; 54 (1): 1-17
- Jawets. 1996. Microbiología Médica. Editorial El Manual Moderno.15 .Edición.pp:834-835
- Jim D. Garlich, Ph. D. 1999. Microbiología del tracto intestinal aviar. College of Agriculture and life Sciences, USA
- Jiraphocakul,S.; Sullivan,W.T.; Shahani,M,K.1990. Influence of dried B.subtilis culture and antibiotics as performance and intestinal microflora in turkey.Poultry Science9:1966-1973
- L. Biancone I.; Monteleone, G.; Del Vecchio Blanco, P.; Vavassori and F. Pallone. 2002. Resident bacterial flora and immune system. **Digestive and Liver Disease. Volume 34, Supplement 2** , September 2002, Pages S37-S43
- La Ragione RM, Narbad A, Gasson MJ, Woodward MJ. 2004. In vivo characterization of Lactobacillus johnsonii FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. Lett Appl Microbiol. 2004;38(3):197-20
- La Ragione RM.; Casula G.;Cutting SM y Woodward MJ.2001. Bacillus subtilis spores competitively excluded Escherichia coli 078:K80 in poultry. Vet Microbiol.2001 Mar20;79 (2):133-42
- Lilley, D.M., Stiwel, R.H.1965. Probiotics:Growth promotion factor produced by microorganism. Science 167:747-748
- Lori Kopp-Hoolihan Ph D. RD. 2001. Prophylactic and Therapeutic Uses of **Probiotics. Journal of the American Dietetic Association.** Volume 101, Issue 2, February 2001, Pages 229-241
- Lyons,P.1997. Opinión los hombres del negocio. Avicultura profesional, 15(7):22

- Maria R. Spinosa.; Tiziana Braccini.; Ezio Ricca.; Maurilio De Felice.; Lorenzo Morelli.; Gianni Pozzi and Marco R. Oggioni. 2000. On the fate of ingested **Bacillus** spores. *Research in Microbiology*. Volume 151, Issue 5, June, 361-368
- Maria Smolander.; Hanna-Leena Alakomi.; Tiina Ritvanen Jukka Vainionpää and Raija Ahvenainen. 2004. Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different **temperature** conditions. A. Time–**temperature** indicators as quality-indicating tools. *Food Control*. Volume 15, Issue 2004: 217-229
- Maruta, K y Miyazaki, L.S. 1996.Exclusion of intestinal patogens by continuos feedingwith *Bacillus subtilis* C-3102 and its influence on intestinal microflora in broilers. *Animal Scienceand Technology Japan*.7:273-280
- Metchnikoff, E.1908. Prolongation of live . Putnams Sons, New Jork
- Mulder, R. 1996. Probiotics and competitiveexclusion microflora againts *Salmonella*. *Wolrd Poultry*. Special *Salmonella*. May, pp.30-32
- Nakano, T.; Shimuzu,M y Fukushima. 1999. Effects af a probiotic on the lipid metabolism of pullet hen as a colesterol- enriched diet. *Biotechnology and Biochemistry*63:1569-1575
- Nisbet D.2002. Defined competitive exclusión cultures in the prevention of enteropathogen colonisation in poultry and swine. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Aug; 1981(1-4): 481-6
- Ortega. M.E. 2003. [www. Infocarne.com/aves/probioticos.asp](http://www.infocarne.com/aves/probioticos.asp)
- Parker, D.S y Armstrong, D.G. 1987. Antibiotic feed additives and livestok production. *Proc. Nutr. Soc.* 46:415
- Parker, R.B 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. Heath*, 29: 4-8
- Philippe B. 2003. EU assessment of enterococci as feed additives. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 88, Issues 2-3 , 1 December 2003, Pages 247-254
- Prats, C.A.1999. Establecimiento de un protocolo experimental para determinar la adherencia in vitro de *Lactobacilos* a las células intestinales del cerdo. Tesis presentada en opción al título de Másters en Radioquímica. ICA.

Sainsbury, D.1993. Protecting against stresses. Probiotics boost natural resistance. Pigs. January/February, pp32

Shubert,R. , Flackowsky. 1999.Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und tier:7.Symposium Jenal/Thuringen, Germany,22.und 2. September 1999.515-518

Vambelle,M ;Teller, E. y Focant, M.1990. Probiotics in animal nutrition. Arch. Anim. Nutr. Berlín, 4 (7)