

**Título: Evaluación de la estabilidad de un cultivo de *Bacillus subtilis* (C-34) para uso como probiótico en pollos.**

Yordanys Martínez Dávalos, Grethel Milián Florido, Manuel Pérez Quintana y Ana J. Rondón Castillo.

Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". Autopista Varadero km 3 ½. Matanzas. Cuba.

\*Autor para la correspondencia. E-mail: yordanys.martinez@umcc.cu

**Resumen.**

Se realizó la evaluación de la estabilidad de un cultivo de *Bacillus subtilis* (C-34) para su uso, posteriormente, como probiótico en pollos. El cultivo fue reactivado bajo las mismas condiciones de aerobiosis por un período de 72 horas para favorecer la esporulación en dos medios: medio tradicional (caldo nutriente enriquecido) y medio modificado (Pérez, 2000). Posteriormente se realizó durante 84 horas una dinámica de crecimiento del cultivo, cuantificándose conteo de totales y de endosporas. La respuesta obtenida fue superior en el medio modificado, seleccionándose este para la elaboración del producto probiótico, al cual se le realizaron los estudios de estabilidad a temperatura ambiente y en refrigeración. Para ello se determinaron indicadores microbiológicos y químicos por un período de tres meses. El pH y el porcentaje de endosporas se mantuvieron estables para ambas condiciones de almacenamiento y los indicadores microbiológicos evaluados: conteo de Enterobacterias, Levaduras y *Lactobacillus* resultaron negativos, después se tomaron muestras del producto, a las cuales se le practicaron análisis de calidad microbiológica como: conteo de coliformes totales y fecales, salmonelas, entre otros, los que evidenciaron su calidad y la posibilidad de almacenarlo a temperatura ambiente. La estabilidad de los cultivos de *Bacillus subtilis* en relación con el pH, el conteo de endosporas y calidad microbiológica demuestran su posible uso como probiótico en aves.

Palabras claves: *Bacillus subtilis* (C-34), medios de cultivo, estabilidad.

**Abstract**

The evaluation of the stability of *Bacillus subtilis* strain (C 34) for his use as probiotic in chickens was made. Cultivation was reactivated under aerobic conditions for a period of 72 hours to favor the sporulation in two medium: Traditional( broth enriched nutrient ) and modified medium (Pérez, 2000). At a later time, a dinamic count of totals cells and endospore during 84 hours of growth was development. The obtained answer was highter in the modified medium, wich was selectet this forproved to be negative, after was took samples of

ct, to make analysis of microbiological quality like count of total and iformes, salmonelas, among others. They evidenced his quality and ibility to store at ambient temperature. The stability of *Bacillus subtilis*

relating to pH, endosporas count and microbiological quality demonstrate his possible use like probiotic in birds.

**Keywords:** *Bacillus subtilis* (C 34), medium of cultivation, stability.

## INTRODUCCIÓN

Debido en gran medida a los altos precios a que se comercializan los productos probióticos en el Mercado Internacional, ha sido interés y objetivo de varias instituciones y grupos de investigación en el país, el desarrollo de tecnologías económicamente viables que permitan la obtención de aditivos biológicos con propiedades probióticas para su empleo en la producción animal (Laurencio *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2007)

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

Se conoce que en la avicultura mundial, se emplean cultivos probióticos a base de *Bacillus* y sus endosporas como inmunomoduladores y mejoradores de la fisiología digestiva, los cuales pueden contribuir a una mejor expresión de los indicadores productivos y de salud.

Antes de elaborar cualquier probiótico es imprescindible aislar y evaluar las cepas a utilizar. Todo esto exige una refinada tecnología que garantice los efectos deseados en los animales con gran estabilidad (Laurencio *et al.*, 2002; Gonzáles y Gonzáles- Martínez, 2006)

Los probióticos para ser eficientes deben tener entre otros aspectos una alta concentración, resistencia a ácidos gástricos y jugos biliares, alta capacidad de adhesión y colonización, viabilidad comprobada, presentación que les permita llegar vivos al sitio de actuación (por ejemplo: intestino), antagonismo contra las bacterias patógenas, y por supuesto los microorganismos utilizados no deben ser patógenos o producir sustancias tóxicas (Salminen 2005; Milián *et al.*, 2005).

Los probióticos tienen que ser microorganismos que además de cumplir con los requisitos anteriormente mencionados deben ser capaces de soportar las condiciones de la producción industrial y mantener gran parte de su viabilidad durante el almacenamiento, en muchas ocasiones en refrigeración o congelación. De no ser así, de nada servirá que un alimento contenga microorganismos promotores de la salud del consumidor ya que no podrá ejercer sus efectos beneficiosos por estar lesionados o muertos. (Gonzáles y Gonzáles-Martínez, 2006)

El objetivo del presente trabajo fue Obtener un probiótico para uso en pollos a partir de un cultivo de *Bacillus subtilis* (C-34), así como evaluar la estabilidad del mismo en el tiempo .

## MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS

### Técnicas y procedimientos generales.

#### Obtención del Preinóculo.

EL cultivo fue reactivado para su estudio bajo las mismas condiciones en dos medios de cultivo, el medio tradicional en Caldo Nutriente enriquecido para el crecimiento de *Bacillus* sp (Herrera, 1985 y HISPANLAB, 1998) y el medio modificado por Pérez, (2000). La composición de los medios empleados se muestra en la **Tabla 2.1**.

Para la obtención del preinóculo se preparó 1 L de cada medio de cultivo, en los cuales el microorganismo tratado se desarrolló en condiciones de aerobiosis. El cultivo se mantuvo durante 72 horas en una Zaranda Orbital a 37 °C y 125 rpm, con el objetivo de obtener un cultivo en condiciones de esporulación pues esta es el modo en que se evalúa el efecto probiótico del mismo (Pérez, 2000).

**Tabla 2.1.** Composición de los medios utilizados.

Medio Tradicional	Medio Modificado
<b>Peptona Bacteriológica 6%</b>	<b>Miel proteica 5%</b>
<b>Triptona 4%</b>	<b>Hidrolizado de levadura 5%</b>
<b>Extracto de Levadura 3%</b>	<b>Peptona bacteriológica 3%</b>
<b>Extracto de Carne 1.5%</b>	<b>CaCl<sub>2</sub> 0.1%</b>
<b>Glucosa 1%</b>	-

#### Los medios de cultivo utilizados para las determinaciones microbiológicas.

Según Harrigan y Mc. Cance, (1968)

- Conteo de Enterobacterias: Agar Mac Conkey .
- Conteo de Levaduras: Agar Extracto de Levadura-Dextrosa-Cloranfenicol.
- Conteo de *Lactobacillus* sp: Agar MRS.
- Conteo de espora de *Bacillus* sp: Agar Nutriente.

#### Dinámica de la obtención de un cultivo probiótico de *Bacillus subtilis* C-34.

Una vez obtenido el preinóculo se monto una dinámica de crecimiento del cultivo cuantificándose conteo de totales y de endosporas en el medio tradicional y el modificado, para determinar la respuesta biológica de la cepa de *B. subtilis* C-34 en ambos medios. Para el conteo de totales las muestras fueron tomadas cada 4 horas durante 24 horas de establecido el cultivo. El

conteo de endosporas se realizó desde las 24 y hasta las 84 horas, en este caso los muestreos se hicieron cada 12 horas.

Para efectuar los conteos totales y de endosporas se tomó 1ml de muestra de cada medio de cultivo y se hicieron diluciones seriadas (Stainer, 1996). Seguidamente se sembraron en placas Petri. La siembra se realizó a las diluciones:  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-13}$ ,  $10^{-14}$ ,  $10^{-15}$ . En el caso particular de las endosporas, antes de realizar la siembra se sometió la muestra a un tratamiento térmico a  $65^{\circ}$  C durante 5 minutos para eliminar toda forma vegetativa (Pérez, 2000). Una vez realizada la siembra se incubaron las placas a una temperatura de  $37^{\circ}$  C por un período de 24 h, una vez concluido el tiempo de incubación se procedió al conteo.

### **Evaluación de la estabilidad de un cultivo de *Bacillus subtilis* C-34.**

#### **Desarrollo de la fermentación.**

A partir de los resultados de los análisis practicados al cultivo desarrollado en el medio tradicional y el modificado por Pérez, (2000) se seleccionó el medio modificado para realizar el proceso de fermentación, teniendo en cuenta que en este medio el cultivo de *B. subtilis* (C-34) mostro una mejor respuesta y por otra parte es un medio menos costoso.

La fermentación se realizó durante 72 horas con el objetivo de que el microorganismo pase de la forma vegetativa a la forma esporulada (Pérez, 2000). Una vez concluido el tiempo de fermentación el producto quedó terminado.

El biopreparado probiótico obtenido a partir del cultivo se envasó en frascos color ámbar de 500 ml de capacidad efectiva. Fueron colocados por cada cultivo de *B. subtilis* (C-34, C-31 y E-44) 15 frascos a temperatura ambiente ( $27-32^{\circ}$  C) y 15 en refrigeración ( $4-8^{\circ}$  C) para su almacenamiento y evaluación de la estabilidad de los mismos.

#### **Evaluación de la estabilidad del cultivo.**

Este estudio se realizó por un período de tres meses con el objetivo de evaluar la estabilidad de los cultivos probióticos almacenados a temperatura ambiente y en refrigeración. Durante la primera semana del experimento, se determinaron diariamente varios indicadores microbiológicos y se determinó el pH, A partir de este momento los análisis de pH e indicadores microbiológicos se realizaron de forma mensual.

Para la determinación de endosporas de *Bacillus* se procedió de igual forma que en el ensayo anterior y la siembra en las placas Petri se realizó con una dilución de  $10^{-15}$ . Para conteo de Enterobacterias y *Lactobacillus*, se empleó la misma dilución y las placas inoculadas se colocaron en condiciones de anaerobiosis. En caso del conteo de levaduras se utilizaron las diluciones:  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ . Una vez realizada la siembra se incubaron las placas a una

temperatura de 37° C por un período de 24 h, al final del cual se procedió al conteo.

### **Análisis de la calidad Microbiológica a los cultivos de *Bacillus subtilis* C-34.**

Una vez concluidos los tres meses en que se almacenó el producto probiótico se tomaron muestras de los cultivos almacenados a temperatura ambiente y en refrigeración, para realizarles análisis de calidad microbiológica. Los análisis practicados fueron:

- Conteo total de microorganismos aerobios termófilos viables.
- Recuento de esporos anerobios.
- Recuento de esporos aerobios mesófilos (después de someter la muestra a 80 °C por 5 minutos).
- Recuento de Enterobacterias totales.
- Recuento de Coliformes totales.
- Recuento de Coliformes fecales.
- Recuento de *Pseudomona aeruginosa*.
- Recuento de *Staphylococcus aureus*.
- Recuento de *Salmonella*.
- Conteo de mohos viables.
- Conteo de levaduras viables.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Dinámica de la obtención de un cultivo probiótico de *Bacillus subtilis* C-34.**

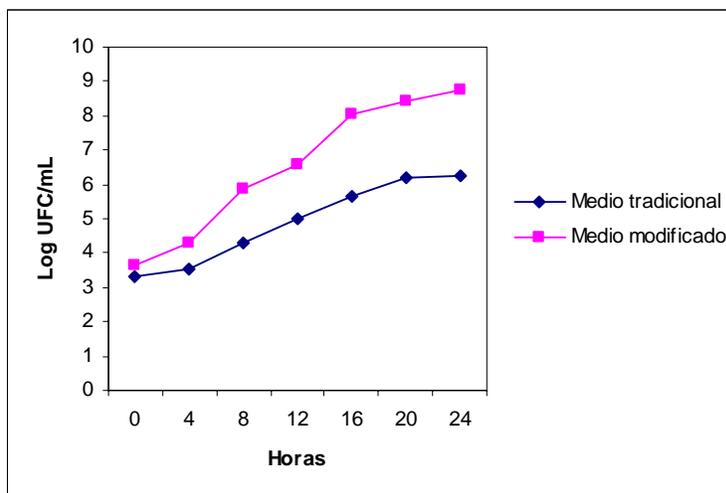
Para evaluar la obtención y el comportamiento del preinóculo en diferentes medios se realizó un estudio de varios indicadores microbiológicos. Se probaron varias diluciones seriadas para los conteos totales y de endosporas, siendo la más efectiva la dilución  $10^{-15}$ , la cual fue empleada durante todo el estudio para estos conteos. La dinámica del conteo de totales durante el tiempo de fermentación se muestra en la **Figura 3.1** Se observa que a partir de las 4 horas se evidencia un crecimiento exponencial en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Bacillus subtilis* C-34 en ambos medios, resultado este que se corrobora con lo expuesto por (Mayea *et al.*, 1997 y Madigan *et al.*, 1997) como el comportamiento normal de este género microbiano.

Si comparamos el desarrollo del preinóculo en el medio modificado con respecto al medio tradicional, el crecimiento fue superior en el medio modificado, detectándose un mayor número de UFC de *B. subtilis* C-34 durante todo el período evaluado. Similares resultados fueron obtenidos por (Pérez, 2000), cuando estudió el comportamiento de una cepa de *Bacillus subtilis* (E-44) en este mismo medio.

El comportamiento de la dinámica de fermentación a partir de las 4 horas de establecido el cultivo, refleja un incremento significativo de los bacilos en el medio modificado, como se muestra en la **Figura 3.1**, resultado que fue corroborado a través del análisis estadístico realizado a los datos experimentales (**Tabla 3.1**). Estos resultados coinciden con lo obtenido por

(Pérez, 2000), lo que demostró la posibilidad de usar este medio modificado para la obtención de un cultivo con fines probióticos.

Los resultados alcanzados indican que las mieles proteicas, así como el hidrolizado de crema de levadura de destilería de alcohol, como sustituto de la glucosa, y el extracto de levadura reactivo, incorporan un grupo de nutrientes que le permiten a este grupo microbiano su incremento, elemento este favorable para la obtención de un preinóculo que puede ser empleado en la elaboración de productos probióticos con componentes de origen nacional.



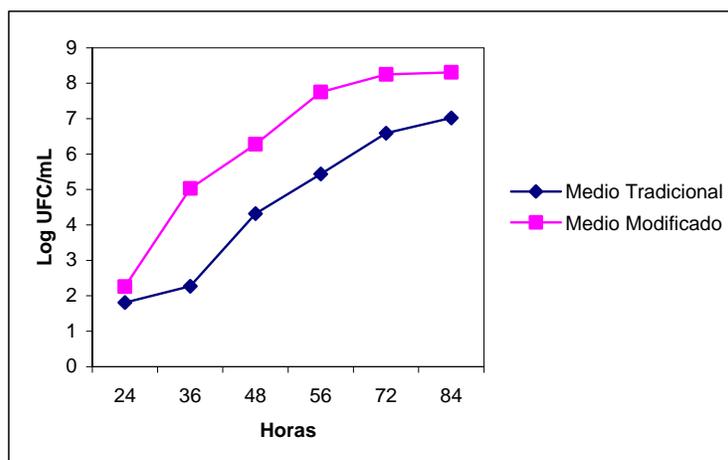
**Figura 3.1.** Dinámica del conteo de totales del cultivo C-34 en los medios tradicional y modificado.

**Tabla 3.1.** Análisis estadístico del conteo de totales del cultivo C-34 en los medios tradicional y modificado.

Horas	Medio Tradicional	Medio Modificado
0	3.31 ± 4.0 ns	3.66 ± 4.0 ns
4	3.53 ± 0.9 <sup>a</sup>	4.30 ± 1.9 <sup>b</sup>
8	4.31 ± 1.9 <sup>a</sup>	5.89 ± 1.3 <sup>b</sup>
12	5.01 ± 1.3 <sup>a</sup>	6.55 ± 0.9 <sup>b</sup>
16	5.65 ± 1.6 <sup>a</sup>	8.05 ± 0.9 <sup>b</sup>
20	6.18 ± 0.9 <sup>a</sup>	8.41 ± 1.6 <sup>b</sup>
24	6.26 ± 1.0 <sup>a</sup>	8.75 ± 1.0 <sup>b</sup>

Los valores representan la media de dos experimentos con 3 réplicas cada uno. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

A partir de las 24 horas de establecido el cultivo que se empleará como preinóculo, se realizó un estudio del proceso de formación de endosporas tanto en el medio tradicional como en el modificado. En la dinámica obtenida se observa que a partir de las 36 horas se produce un incremento significativo de las UFC en el medio modificado, como se muestra en la **Figura 3.2**. Estos resultados fueron corroborados a través del análisis estadístico realizado a los datos experimentales. Se detectaron diferencias significativas entre las cantidades de UFC obtenidas en ambos medios a partir de las 36 horas de establecido el cultivo en todas las evaluaciones realizadas durante el tiempo en que se llevó a cabo el estudio (**Tabla 3.2**). A partir de las 72 horas el número de endosporas obtenidas en los dos cultivos se mantuvo prácticamente constante, lo que se corresponde con lo planteado por Pérez, (2000), por lo cual se realizaron los últimos conteos a las 84 horas.



**Figura 3.2.** Dinámica del conteo de endosporas del cultivo C-34 en el medio tradicional y modificado.

**Tabla 3.2.** Análisis estadístico del conteo de endosporas del cultivo C-34 en los medios tradicional y modificado.

Horas	Medio Tradicional	Medio Modificado
24	1.81 ± 0.2 ns	2.26 ± 0.2 ns
36	2.27 ± 1.3 <sup>a</sup>	5.03 ± 1.3 <sup>b</sup>
48	4.32 ± 1.6 <sup>a</sup>	6.28 ± 0.7 <sup>b</sup>
56	5.44 ± 0.7 <sup>a</sup>	7.75 ± 0.9 <sup>b</sup>
72	6.59 ± 0.9 <sup>a</sup>	8.25 ± 0.2 <sup>b</sup>
84	7.02 ± 0.2 <sup>a</sup>	8.31 ± 1.6 <sup>b</sup>

Los valores representan la media de dos experimentos con 3 réplicas cada uno. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Como se conoce el uso de probióticos a partir del género *Bacillus* es en forma de endosporas, debido a la factibilidad de su obtención industrial, conservación y almacenamiento. Además de la capacidad que tiene de estimular el sistema inmunológico, producción de sustancias antimicrobianas, enzimas de tipo proteolíticas, aminolíticas y otras, además de estimular los procesos digestivos a nivel del tracto gastrointestinal (Casula y Cutting, 2002 y Barbosa *et al.*, 2005). Existen cultivos de *Bacillus* en formas esporuladas que se han conservados por más de 20 años (Madigan *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos muestran que se pueden obtener un mayor número de endosporas de *Bacillus subtilis* C-34 y en un menor tiempo con el empleo del medio modificado, las cuales pueden ser conservadas y almacenadas con el propósito de elaborar diversos productos probióticos, para su empleo en la producción animal.

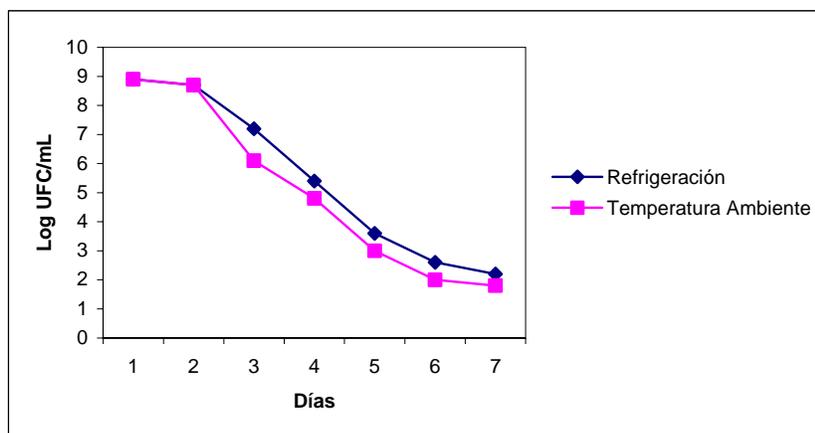
### **Evaluación de la estabilidad de un cultivo de *Bacillus subtilis* C-34**

Tomando como base los resultados del ensayo anterior se realizó una fermentación empleando un cultivo de *Bacillus subtilis* C-34 en el medio de cultivo modificado, en el cual se obtuvieron los mayores conteos totales y de endosporas. La fermentación se llevó a cabo por un período de 72 h con el objetivo de que el microorganismo pase de la forma vegetativa a la forma esporulada (Pérez, 2000). Una vez concluido el tiempo de fermentación el producto quedó terminado, fue envasado y los frascos fueron almacenados a temperatura ambiente (27-32 °C) y en refrigeración (4-8 °C).

A partir de este momento y durante los siguientes 7 días se realizó un estudio con el objetivo de determinar la estabilidad producto. Se evaluaron varios indicadores microbiológicos en cultivos desarrollados a temperatura ambiente y en refrigeración. Se probaron varias diluciones seriadas para los conteos de Enterobacterias, *Lactobacillus* y Levaduras, empleándose finalmente una dilución de  $10^{-15}$  para los dos primeros y  $10^{-7}$  para el conteo de Levaduras. Los resultados obtenidos fueron negativos para el conteo de Enterobacterias, Levaduras y *Lactobacillus* sp, lo cual constituye un indicativo de la estabilidad del cultivo desarrollado en ambas condiciones.

Durante este período se evaluaron además el número de endosporas y el comportamiento del pH.

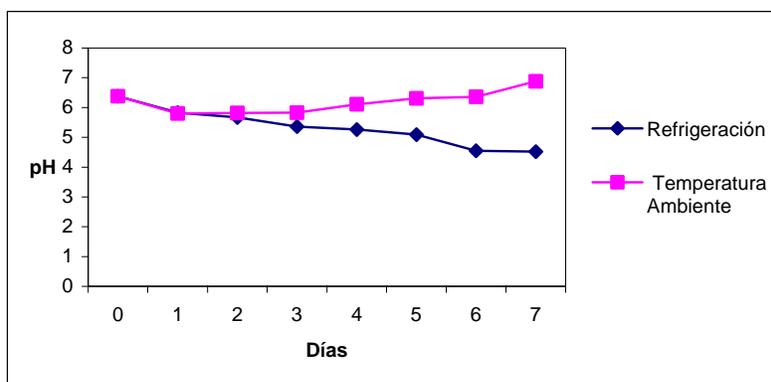
En la **Figura 3.3** se muestran los conteos de endosporas realizados a los cultivos desarrollados a temperatura ambiente y en refrigeración. El comportamiento es similar en los días 1 y 2, posteriormente se observa un decrecimiento en el conteo de endosporas elemento que nos indica la estabilidad en el tiempo del cultivo de *Bacillus subtilis* C-34.



**Figura 3.3** Conteo de las endosporas en el tiempo.

El comportamiento del pH se muestra en la **Figura 3.4**, observándose de forma general mayores valores en condiciones de temperatura ambiente, esta diferencia es más marcada a partir del día 3 y se mantiene durante los días siguientes.

La existencia de mayores valores de pH en el producto probiótico a temperatura ambiente pudiera estar relacionado con la germinación de endosporas, producción de metabolitos secundarios y la hidrólisis de proteínas desarrolladas por estas células viables con el aporte de compuestos que hacen el pH menos ácido, aunque este hecho no está totalmente dilucidado.



**Figura 3.4.** Comportamiento del pH en las diferentes condiciones de almacenamiento.

Una vez concluida la primera semana de almacenamiento del producto probiótico, se evaluó de forma mensual durante los próximos 3 meses de almacenamiento el comportamiento del pH y del número de endosporas.

Los resultados obtenidos no reflejan diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones de almacenamiento en el comportamiento del pH como se muestra en la **Tabla 3.3**, elemento este que reviste gran significación para una adecuada conservación de los productos probióticos (González y González-Martínez, 2006).

**Tabla 3.3.** Comportamiento del pH durante 3 meses de almacenamiento.

Mes	1	2	3
Comportamiento del pH en refrigeración	4.52±0.1	4.5±0.2	4.51±0.1
Comportamiento del pH a temperatura ambiente	6.88±0.1	6.8±0.2	6.89±0.1

Los valores representan la media de dos experimentos con 3 réplicas cada uno. Las medias fueron comparadas según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

En la **Tabla. 3.4** se presentan los conteos de endosporas en ambas condiciones de almacenamiento. En todos los casos se observa conteos similares a los obtenidos después de transcurrida una semana, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las dos condiciones de almacenamiento. Este resultado resulta de gran importancia ya que es imprescindible para un adecuado almacenamiento de un producto probiótico que el por ciento de endosporas se mantenga estable, debido a que estos normalmente tienen que permanecer en las áreas de producción o en instalaciones que en muchas ocasiones no cuentan con condiciones para el almacenamiento de los productos que no serán usados rápidamente y requieran refrigeración. Las endosporas por ser estructuras de resistencia de los *Bacillus* se mantienen viables durante largos períodos de tiempo lo que facilita su empleo práctico como probiótico en la producción avícola (Dunne *et al.*, 2001; Milián *et al.*, 2005; González y González-Martínez, 2006).

**Tabla 3.4.** Conteo de endosporas a diferentes condiciones de almacenamiento durante los 3 meses.

Mes	1	2	3
Conteo de endosporas en Refrigeración	2.2 ± 0.1	2.0 ± 0.2	2.1 ± 0.1
Conteo de endosporas Temperatura Ambiente.	1.8 ± 0.3	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.4

Los valores representan la media de dos experimentos con 3 réplicas cada uno. Las medias fueron comparadas según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Aunque los resultados obtenidos resultan alentadores, debemos plantear que por la importancia que tiene este aspecto dentro del proceso de producción, se requiere seguir profundizando en estos estudios, tanto desde el punto de vista teórico como práctico, buscando alternativas que permitan la obtención de preparados probióticos de mejor calidad.

### 3.3 Análisis de la calidad Microbiológica al cultivo de *Bacillus subtilis* (C-34).

La observación al microscópico a partir de una preparación de Gram mostró que existen formas bacilares y abundantes estructuras esporuladas.

Los diferentes análisis realizados a las muestras los cuales se resumen en la **Tabla 3.5**. Resultaron negativos para Enterobacterias totales, Coliformes totales, Coliformes fecales, *Pseudomonas auruginosas*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Salmonella*. Por otra parte se detectaron en las muestras analizadas aerobios termófilos viables, esporos anaerobios, mohos y levaduras viables, los cuales se encuentran en muy pequeñas cantidades y no afectan la calidad del producto. Estos resultados muestran que el probiótico obtenido se encuentra libre de varios de los principales microorganismos que afectan la salud animal y que constituye un producto probiótico con una adecuada calidad para su empleo en la producción animal.

**Tabla 3.5** Resultados de la calidad microbiológica.

Pruebas microbiológicas	Resultado
Conteo total de aerobios termófilos viables	<10 UFC/mL
Recuento de esporos anaerobios	< 2,2 NMP/100mL
Recuento de Enterobacterias totales	Negativo
Recuento de coliformes totales	Negativo
Recuento de coliformes fecales	Negativo
Recuento de <i>Pseudomonas auruginosas</i>	Negativo
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
Recuento de <i>Bacillus cereus</i>	Negativo
Conteo de mohos viables	< 10 UFC/mL
Conteo de <i>Salmonella</i> en 25 mL	Negativo
Conteo de levaduras viables por mL	< 10 UFC/mL

## CONCLUSIONES

Se logró un mayor conteo de totales y de endosporas de *Bacillus subtilis* C-34 con el empleo del medio de cultivo modificado.

Se evidenció la elevada estabilidad del biopreparado obtenido a partir del cultivo de *Bacillus subtilis* C-34 desde el punto de vista químico y microbiológico, lo que demuestra la posibilidad de su uso como probiótico en aves.

El análisis económico evidenció que resulta menos costoso económicamente la obtención y conservación a temperatura ambiente del cultivo probiótico de *Bacillus subtilis* C-34.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Barbosa, T.M., Serra, C.L., La Regione. R M, Woodward, J.M y Henríquez, A.O. 2005. Screening for *Bacillus* in the Broiler Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(2): 968-978
- Casula, G. y Cutting, S.M. 2002. *Bacillus* Probiotics: Spore Germination in the Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (5): 2344-2352.
- 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*. 30: 4215-4224.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *American Journal Clinic. Nutrition*.73: 92-386
- González F. y González-Martínez, B. 2006. Criterios de calidad de los microorganismos probióticos y evidencias sobre efectos hipocolesterolémicos. *Saluscum propositum vital*. 7(1): 77-85.
- Guillot, J. F. 2000. The pros and cons of probiotics. Make probiotics work for poultry. *World Poultry*. 16(7):18-21.
- Harrigan, W. F y Mc. Cance, M. 1968. Métodos de Laboratorio en Microbiología. Academia, España.
- Herrera. G. A.,1985. Manual de Medios de Microbiología. Científica-Técnica. La Habana
- Jadamus, A., Vahjen, W. y Simon, O. 2001. Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. *Arch.Tierernahr*. 54 (1): 1-17.
- La Ragione, R.M., Casula, G., Cutting, S.M. y Woodward, M.J. 2001. *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* O78:K80 in poultry. *Veterinary Microbiology*. 79 (2):133-42.
- Laurencio, M., Pérez, M., Piad, R., Milián, G., Rondón, A.J., Amigo, S., Bocourt, R., Savón, L. y Díaz, M. 2002. Determinación del contenido de bacterias ácido lácticas y *Bacillus* del TGI de pollos de ceba y obtención de una mezcla de exclusión competitiva a partir de esta microflora cecal. *Revista Cubana de Ciencia Avícola*. 28: 98-103.
- Laurencio, M., Pérez, M., Piad, R., Milián, G. 2005. Evaluación de la actividad probiótica de un producto de exclusión competitiva sobre

indicadores microbiológicos en pollos de ceba. *Brazilian Journal Food Technology*. 5:103-108

- Madigan, M.T, Martinko, J. M y Parker, J. 1997. *Brock Biology of Microorganisms*. 7 ed. Prentice Hall Internacional. London. p. 722-728.
- Mayea, S., Carone, M., Novo, R., Boado, I., Silveira, E., Soria, M., Morales, Y., y Valiño, A. 1997. *Microbiología Agropecuaria*. La Habana. Felix Varela. p. 16-77.
- Milián, G., Pérez, M., Martiatus, Y., Bocourt, R. 2005. Empleo de probióticos a base de *Bacillus* y sus endosporas en la producción avícola. CD-ROM ISBN: 959-16-0295- 2005.
- Pérez, M. 2000. Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Agraria de La Habana. Cuba.
- Pérez, M., Piad, R., Milián, G., das Gracias F.M., A. Ferreira, de Mancilha, I.M., Laurencio, M. y Batista de Almeida, J. 2007. Preparation of a crude enzymatic from *Bacillus licheniformes* E-44 and its evaluation in the hydrolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 452–455.
- Spinosa, M.R., Braccini, T., Ricca, E. y De Felice, M. 2000. On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Res. Microbiology*. 151: 361-36.
- Stanier, R. S. 1996. *Microbiología*. 2<sup>da</sup> ed Revert. Barcelona. 750 p.