

Artículo original

Efecto de endosporas de *Bacillus subtilis* E-44 con actividad probiótica sobre indicadores fermentativos en órganos digestivos e inmunológicos de pollos de engorde

Manuel Pérez Quintana^{a,*}, Grethel Milian Florido^b, Ana J. Rondón^b, Ramón Bocourt Salabarría^c, Verena Torres^c

^aDepartamento de Ciencias de la Tierra, Universidad Estatal Amazónica, Puyo-Pastaza, Ecuador. ^bCentro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos", Matanzas, Cuba. ^cDepartamento de Fisiología, Instituto de Ciencia Animal, San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba.

Recibido 19 de abril de 2015; aceptado 9 de octubre de 2015

Resumen: El objetivo de este trabajo fue emplear endosporas de *Bacillus subtilis* con actividad probiótica sobre indicadores fermentativos en órganos digestivos e inmunológicos de pollos de engorde. Se estudiaron tres cepas de *B. subtilis* obtenidos en trabajos previos (C-31, C-34 y E-44). Las tres cepas resistieron condiciones de pH ácido y sobrevivieron a la presencia de sales biliares. La cepa E-44 tuvo mayor capacidad de crecimiento y producción de endosporas, escogiéndose para la realización de los estudios posteriores. Se realizó un experimento con pollos de engorde y tres tratamientos con endosporas: control sin endosporas; baja dosis con $1,0 \times 10^6$; dosis media con $1,0 \times 10^7$ y dosis alta con $1,0 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹.kg de alimento. En el ciego de los pollos, la cepa E-44 a la dosis alta produjo mayor acidez y mayores contenidos de ácidos láctico, butírico, propiónico, acético y ácidos grasos de cadena corta totales. El peso relativo de la bolsa de Fabricio y el bazo, así como la inhibición de la hemaglutinación, fueron mayores en los animales que recibieron endosporas con la dosis media a los 42 días. Se concluye que se produjo una mejoría en la respuesta del sistema inmune de los pollos con el empleo del cultivo de endosporas de *B. subtilis* E-44 evaluado.

Palabras clave: endosporas, *Bacillus subtilis*, probiótico, pollos de engorde, resistencia a pH, sales biliares, respuesta inmune.

Effect of *Bacillus subtilis* E-44 strain endospores with probiotic activity on fermentative indicators in digestive and immune organs of broilers

Abstract: The aim of this study was the use of endospores of *Bacillus subtilis* with probiotic activity on fermentative indicators in digestive and immune organs of broilers. Three *B. subtilis* strains isolated from previous studies (C-31, C-34 and E-44) were used. The three strains resisted acid pH conditions and survived the presence of bile salts. E-44 strain had greater capacity for growth and endospore production was chosen to carry out further studies. An experiment with broilers and three treatments were performed with endospores at different concentrations administered with food. Control: without endospores; low dose: 1.0×10^6 ; medium and high dose 1.0×10^7 and 1.0×10^8 CFU/mL per Kg of food respectively. Results showed that strain E-44 at high dose, in the ceca of the chickens produced higher acidity and higher content of lactic, butyric, propionic, acetic and total short chain fatty acids. The relative weight of the bursa of Fabricius and spleen, as well as hemagglutination inhibition, after 42 days of treatment, were greater in animals receiving endospores at the medium dose. We concluded that there was an improvement in the immune response of chickens with the use of endospores of *B. subtilis* E-44 strain at the given dose.

Keywords: endospores, *Bacillus subtilis*, probiotic, broilers, pH resistance, bile salts, immune response.

* Correspondencia:

E-mail: mpquintana1960@gmail.com

Introducción

En la producción animal deben existir buenas condiciones sanitarias y un rendimiento productivo que permita obtener resultados económicos y sostenibles. Existe una relación directa entre el funcionamiento del tracto intestinal, la tasa de crecimiento, índice de conversión, el buen balance

microbiano intestinal y la salud en los animales [1]. Para evitar enfermedades, estos se someten a tratamientos con antibióticos que eliminan patógenos y fomentan la flora bacteriana necesaria para el buen funcionamiento del aparato digestivo [2]. Una solución para asegurar el rendimiento de la alimentación, es la prevención de las variaciones de la flora, garantizando la presencia de suficientes bacterias

beneficiosas que inhiban el desarrollo de patógenos [3]. En tal sentido, en los últimos años, el uso de probióticos en la profilaxis y terapia de enfermedades gastrointestinales ha sido objeto de interés y controversia científica. Hoy en día se reconoce la importancia y posible eficacia de probióticos y prebióticos en el tratamiento de enfermedades digestivas [4].

En la producción animal las endosporas de *Bacillus* spp. constituyen una alternativa al uso de los antibióticos en la promoción del crecimiento [5]. Sin embargo, es necesario continuar investigando la eficacia de estos biopreparados para mejorar la fisiología digestiva y los indicadores de salud. Son insuficientes los resultados reportados en la literatura donde se evaluó el comportamiento dinámico de la actividad probiótica de aditivos alimentarios sobre indicadores fermentativos y relacionados con la respuesta inmunológica en aves. El presente trabajo tuvo como objetivo utilizar un cultivo esporulado de *Bacillus* sp. con actividad probiótica *in vitro* y evaluar su efecto sobre indicadores fermentativos en órganos digestivos y relacionados con la respuesta inmune de pollos de engorde.

Materiales y métodos

Criterios de selección probiótica *in vitro*: Se utilizaron 3 cepas de *Bacillus subtilis* aisladas en un trabajo previo (C-31, C-34 y E-44) [6].

Resistencia a pH ácido: Se realizó a partir de la inoculación de las cepas en fase esporulada según Milian *et al.* [7].

Resistencia a las sales biliares: Se realizó siguiendo la misma metodología descrita para el estudio de pH. Se agregaron al medio de cultivo 1,5 g.L⁻¹ de bilis [7].

Crecimiento microbiano y formación de endosporas: El cultivo y la inducción de la esporulación se realizó como describen Duc *et al.* [8]. El número de endosporas al final del cultivo fue determinado mediante conteo de células viables.

Identificación molecular: Se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual se aplicó al cultivo de *Bacillus* spp. E-44 seleccionado por su resistencia a pH ácido, a sales biliares y su capacidad de crecimiento. La extracción del ADN se realizó por el método de Henderson *et al.* [9]. La amplificación del ADN se realizó según Casula y Cuting [10].

Para la amplificación y posterior secuenciación del ADN se utilizaron cebadores para *Bacillus* spp. reportados por Goto *et al.* [11].

El ADN amplificado se purificó a partir de la extracción directamente del gel de agarosa de la banda de peso molecular entre 200 a 300 pares de bases y seguidamente se realizó una nueva PCR.

La muestra fue secuenciada en la Universidad de León, España, con un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y comparadas con la base de datos internacional GenBank con el software

BLAST [12].

Evaluación del uso de endosporas de *Bacillus subtilis* E-44 en pollos de engorde: El experimento se desarrolló en el Instituto de Ciencia Animal, Cuba. Se emplearon 1.000 pollos de engorde del híbrido EB₂₄ de 1-42 días de edad, en un diseño completamente aleatorizado, con una dieta base de maíz-soya, que varió en su composición según recomendaciones del National Research Council (NRC) [13].

Los animales fueron alojados en jaulas metálicas siguiendo los protocolos de mantenimiento y condiciones apropiadas de cuidado y con personal calificado para tal fin, acordes a la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [14].

La dieta fue aplicada bajo un sistema de alimentación *ad libitum* y el agua suministrada en bebederos de niple, tratada con hipoclorito de calcio al 0,1%. Se empleó el esquema de vacunación siguiente: El primer día la primera dosis contra las enfermedades de Gumboro, Marek, bronquitis infecciosa y la vacuna contra la viruela aviar. A los siete días se aplicó la segunda dosis contra la enfermedad de Gumboro, a los 14 días la vacuna contra la enfermedad de Newcastle y a los 21 días la tercera dosis contra la enfermedad de Gumboro.

El cultivo de endosporas fue separado del medio de cultivo mediante centrifugación a 2.000 g e introducido en el alimento en cuatro tratamientos experimentales: control sin endosporas; dosis baja (DB) con 1,0x10⁶; dosis media (DM) con 1,0x10⁷ y dosis alta (DA) con 1,0x10⁸ UFC. mL⁻¹.kg de concentrado⁻¹.

Se sacrificaron 8 aves por tratamiento mediante aturdimiento eléctrico por personal competente para evitar dolor. Se extrajeron ileon y ciego para determinar ácidos grasos de cadena corta totales (AGCC) y fraccionados, ácido láctico y pH, a los 35 y 42 días de edad. El peso de la bolsa de Fabricio, el bazo y los títulos de inhibición de la hemoaglutinina (HI) para la vacuna contra Newcastle fueron medidos a los 35 y 42 días.

Los AGCC totales y los ácidos acético, propiónico, butírico y láctico se determinaron utilizando un cromatógrafo Krom gas-líquido y detector de llama, según Kumprecht *et al.* [15].

Los títulos de HI para la vacuna contra el virus Newcastle se realizaron según el método beta para microtitulación [16].

Análisis estadístico: Se utilizó el análisis de varianza de clasificación simple y la prueba de comparación de Duncan [17] para el análisis de las concentraciones de ácidos láctico, butírico, propiónico, acético y AGCC totales entre los tratamientos, así como para evaluar las variaciones de pH, peso relativo de la bolsa de Fabricio y del bazo en el tiempo y entre tratamientos. De igual manera se hicieron análisis entre tratamientos para el porcentaje de sobrevivencia bacteriana a pH 3 y a 1,5 g.L⁻¹ de sales biliares, y para la dinámica en el tiempo del crecimiento bacteriano y la producción de endosporas.

Resultados y discusión

Resistencia a pH ácido: Las 3 cepas de *Bacillus* spp. evaluadas fueron capaces de soportar los tres pH ácidos que se simularon *in vitro*, durante tres horas (Figura 1). La capacidad de las cepas de resistir niveles ácidos de pH es necesaria, ya que, cuando se usa un cultivo microbiano como probiótico vía oral, este tiene que someterse, durante su tránsito hacia el intestino, a la acción de la barrera ácida del estómago, donde el pH puede alcanzar valores de 2 [18]. Si los microorganismos sobreviven a esta barrera química, es posible que puedan alcanzar el tracto digestivo inferior donde van a desarrollar su acción probiótica, contribuyendo al mantenimiento de un adecuado balance en la microbiota intestinal. Se conoce que muchos factores pueden afectar este balance, sin embargo, se ha reportado que el empleo de probióticos a base de cultivos de *Bacillus* spp. y sus endosporas contribuye a mejorar dicho equilibrio, aunque es necesario tener en cuenta, en su selección, la resistencia a las barreras ácida y biliar [7].

Los resultados del presente experimento coinciden con

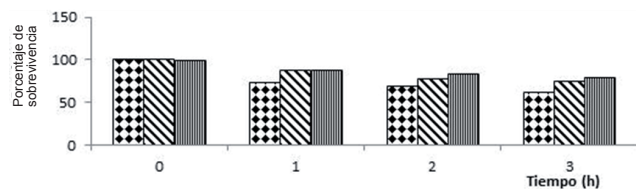


Figura 1. Porcentaje de sobrevivencia en el tiempo, a pH 3, de las cepas estudiadas.

los encontrados por Jadamus *et al.* [19] al evaluar cepas de *B. subtilis* y *B. licheniformes*. Dichas cepas demostraron la capacidad que tienen de resistir condiciones de pH ácido.

Resistencia a las sales biliares: Las cepas evaluadas de *B. subtilis* mostraron capacidad para sobrevivir al efecto de las sales biliares, según se muestra en la figura 2. Hyronimus *et al.* [20] evaluaron 13 cepas de *Bacillus* aisladas del tracto gastrointestinal (TGI), sin embargo, sólo 2 sobrevivieron en presencia de sales biliares. En un trabajo realizado por Mantilla y Burgos [21] obtuvieron 3 cepas nativas con potencial probiótico pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. y *Saccharomyces* spp., las cuales mostraron tolerancia a las condiciones del TGI como crecimiento a pH 3 y concentración de sales biliares de 3 g.L⁻¹. Estos cultivos mostraron eficacia en exclusión competitiva de patógenos *in vitro*, así como una elevada capacidad de crecimiento. De acuerdo a los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo, se evidenció que las

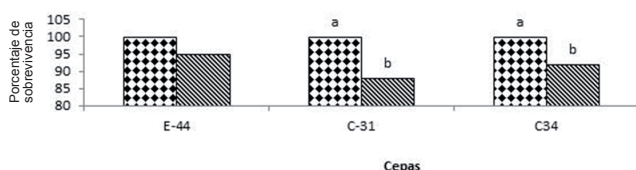


Figura 2. Porcentaje de sobrevivencia en el tiempo a 1,5 g.L⁻¹ de sales biliares de las cepas estudiadas.

cepas de *Bacillus* spp. pueden ser resistentes a los fluidos biliares simulados en condiciones *in vitro* (Figura 2).

Crecimiento microbiano y formación de endosporas: En la figura 3 se presentan los resultados obtenidos con las tres cepas (C-31, C-34 y E-44) en cuanto a la dinámica de crecimiento microbiano y la producción de endosporas. Se observó mayor capacidad de crecimiento y producción

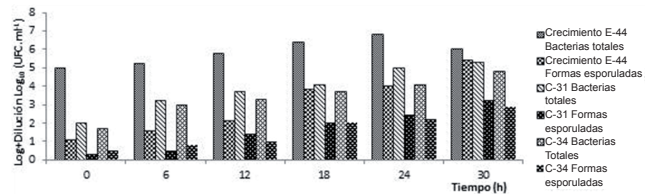


Figura 3. Dinámica de crecimiento bacteriano y producción de endosporas de las cepas estudiadas.

de endosporas en la cepa E-44. En las primeras horas comenzó el crecimiento de los cultivos y se mantuvo en fase logarítmica hasta las 24 horas. A partir de este momento y hasta las 72 horas, se inició la fase estacionaria: las células dejaron de multiplicarse por disminución de nutrientes y aumento de sustancias tóxicas en el medio. En la dinámica de producción de endosporas se observó un comportamiento similar al crecimiento típico de este género microbiano para las tres cepas evaluadas. A partir de las 24 hasta las 30 horas, se observó un incremento en la producción de endosporas. El elevado número de endosporas para probióticos, garantiza la conservación y la viabilidad de estas bacterias por largos períodos de tiempo [22].

Debido a los resultados obtenidos en estos experimentos, se escogió a la cepa de *B. subtilis* E-44 para ser caracterizada molecularmente y evaluar su posible uso como probiótica sobre indicadores fermentativos en órganos digestivos y relacionados con la respuesta inmune en pollos de engorde.

Identificación molecular de la cepa de *B. subtilis* E-44: La secuencia molecular de la cepa E-44 fue:

```
GACTACGTTAATATCTTGCATTACTAATTGAATGTG
AATTACTTCTGTTATCTAGTTTTCAAAGAACAACAT
CTCGAAGAATCGAATGATCCTTCAAACCTAAACAA
GACAGGGAACGTTCTGTTTATAAGACCCAAGGTCT
TATATTCCGTTAAAATCCTTAGAAAGGAGGTGA
```

Esta secuencia presenta un 100% de identidad con *B. subtilis* al compararla con secuencias registradas en la base de datos del GenBank.

Evaluación del uso de endosporas de *Bacillus subtilis* E-44 en pollos de engorde:

Dinámica del comportamiento de algunos indicadores fermentativos en órganos digestivos: Los contenidos de ácido láctico, butírico, propiónico, acético y AGCC totales a los 42 días de edad, en el ciego de pollos de engorde, se presentan en la tabla 1. Todos los contenidos fueron

superiores ($p \leq 0,01$) utilizando el tratamiento DA con respecto al resto de los tratamientos. Los valores de pH en los contenidos cecal e ileal a los 35 y 42 días de edad de los animales se muestran en la tabla 2. Se observó una disminución del pH en ambos ambientes, con todos los tratamientos evaluados. A los 35 días se obtuvieron los valores más bajos de pH con el tratamiento DA mientras que a los 42 días los valores más bajos se obtuvieron con los tratamientos DM y DA, sin diferencias significativas entre ambos ($p < 0,01$).

Los AGCC y el ácido láctico que se forman en el intestino,

Tabla 1. Contenido de ácido láctico, butírico, propionico, acético y ácidos grasos totales en el ciego a los 42 días de edad de los animales con cuatro dosis de endosporas de *Bacillus subtilis* E-44.

Tratamientos (UFC.ml ⁻¹)	42 días				
	AL (mmol/L)	AB (mmol/L)	AP (mmol/L)	AA (mmol/L)	AGCC totales (mmol/L)
Control	1,0 ^a	3,0 ^a	4,0 ^a	7,0 ^a	14,0 ^a
DB (1,0x10 ⁶)	1,0 ^a	3,0 ^a	5,0 ^a	7,5 ^a	15,0 ^a
DM (1,0x10 ⁷)	1,2 ^a	3,6 ^a	5,7 ^a	7,8 ^a	17,0 ^a
DA (1,0x10 ⁸)	2,0 ^b	7,0 ^b	8,0 ^b	9,5 ^b	24,0 ^b
(ES±)	*1,25	1,34*	1,56*	1,13**	1,24*

^{a,b} Letras diferentes entre indicadores medidos difieren para $p < 0,05$ (Duncan). AL: ácido láctico, AB: ácido butírico, AP: ácido propiónico, AA: ácido acético y AGCC: ácidos grasos de cadena corta. (ES±): error estándar. DB: dosis baja, DM: dosis media y DA: dosis alta. * $p \leq 0,01$ y ** $p \leq 0,001$

Tabla 2. Valores de pH en los contenidos cecal e ileal a 35 y 42 días de edad de los animales tratados con cuatro dosis of endosporas de *Bacillus subtilis* E-44.

Tratamientos (UFC.ml ⁻¹)	35 días		42 días	
	Ileon	Ciego	Ileon	Ciego
Control	6,6 ^a	6,2 ^a	6,4 ^a	6,0 ^b
DB (1,0x10 ⁶)	6,2 ^b	6,0 ^a	5,8 ^b	5,5 ^b
DM (1,0x10 ⁷)	6,1 ^b	5,8 ^a	5,4 ^b	5,3 ^a
DA (1,0x10 ⁸)	5,7 ^c	5,3 ^b	5,5 ^b	5,3 ^a
(ES±)	*1,13	1,15*	1,07*	1,23*

^{a,b,c} Letras diferentes entre indicadores medidos difieren para $p < 0,05$ (Duncan). * $p < 0,01$. (ES±): error estándar. DB: dosis baja, DM: dosis media y DA: dosis alta.

juegan un importante papel en el control del crecimiento bacteriano de enteropatógenos en ese ecosistema [23]. Además, se manifiesta un efecto trófico sobre el epitelio intestinal, lo que favorece los procesos de digestión y absorción de nutrientes, con una respuesta favorable en los indicadores productivos, peso vivo y conversión alimenticia. Se observó que el ácido butírico, que es el que contribuye con mayor peso específico al efecto trófico del epitelio intestinal, tuvo el mejor comportamiento con el

tratamiento de DA. Aunque no está totalmente dilucidado, se plantea que uno de los efectos de los cultivos de *Bacillus* spp. y sus endosporas radica en favorecer el incremento de la población de especies de *Lactobacillus* a nivel del tracto digestivo, con un aumento en la producción de ácido láctico y una disminución del pH intestinal, con incremento de *Enterococcus*, *Bacillus* y bacterias totales, así como disminución de *Staphylococcus*, coliformes y enterobacterias [23].

Dinámica del comportamiento de algunos indicadores relacionados con la respuesta inmune: El peso relativo de la bolsa de Fabricio y del bazo a los 35 y 42 días, mostraron mejor comportamiento ($p < 0,001$) en todos animales que recibieron tratamiento con endosporas, como se observa en la tabla 3. Estos resultados están dentro de los índices normales que estableció Giambrone con su método para calcular la adecuada inmunocompetencia de las aves con el peso de estos órganos inmunes y el peso vivo [24]. Según este criterio, los pollos en este experimento no se encuentran inmunodeprimidos.

Se obtuvo un mayor peso relativo de la bolsa de Fabricio

Tabla 3. Peso relativo de bolsa de Fabricio y bazo a 35 y 42 días de edad de los animales tratados con cuatro dosis de endosporas de *Bacillus subtilis* E-44.

Tratamientos (UFC.ml ⁻¹)	35 días		42 días		Títulos HI vacuna Newcastle
	Bolsa de Fabricio	Bazo	Bolsa de Fabricio	Bazo	
Control	0,14 ^c	0,12 ^b	0,14 ^c	0,12 ^b	1:16.0c
DB(1,0x10 ⁶)	0,17 ^b	0,10 ^b	0,20 ^b	0,13 ^b	1:22.6b
DM(1,0x10 ⁷)	0,19 ^b	0,13 ^b	0,21 ^b	0,18 ^a	1:21.5b
DA(1,0x10 ⁸)	0,22 ^a	0,18 ^a	0,24 ^a	0,18 ^a	1:28.3a
(ES±)	0,08*	0,15**	0,21*	0,16*	0,10*

^{a,b,c} Las medias en la columnas difieren para $p < 0,05$ (Duncan). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. (ES±): error estándar. DB: dosis baja, DM: dosis media y DA: dosis alta.

a los 35 días con el tratamiento de DA de endosporas de *B. subtilis* E-44 ($p < 0,01$); el peso del bazo también fue mayor en este tratamiento ($p < 0,01$). A los 42 días se obtuvo la misma respuesta para el peso relativo de la bolsa de Fabricio ($p < 0,01$), pero no hubo diferencias significativas en comparación con el peso relativo del bazo. El resultado obtenido sugiere una mejor respuesta del sistema inmune de las aves, por lo que se considera que el empleo de estos cultivos induce procesos de inmunomodulación. Un adecuado tamaño, con un estado fisiológico favorable, favorece el desarrollo de linfocitos B en las aves. [24].

Los títulos de HI para la vacuna contra el virus de Newcastle se presentan en la tabla 3. Hubo diferencias entre los grupos tratados y el control, pero en la medida que se incrementó la dosis aumentaron los valores de estos ($p < 0,01$) siendo mayores en el tratamiento DA con títulos de 1:28. Se observó un efecto inmunoestimulante con este

tipo de cultivos probióticos sobre los títulos de HI para la medición de la respuesta inmune a través de la vacuna contra el virus de Newcastle. La hemoaglutinina es parte de la glicoproteína viral involucrada en la absorción del virus, por lo que los anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación limitan la infección por este virus. Se comprobó que en los pollos existe una alta relación entre el título de estos anticuerpos y la protección del sistema inmune, por lo que se considera como un indicador viable que relaciona la eficacia de la vacuna y la inmunidad general [25].

Nakano *et al.* [26] obtuvieron respuesta positiva de *Bacillus* spp. en el incremento del peso de la bolsa, el bazo y los títulos de HI para la vacuna contra el virus de Newcastle. Por su parte, Khaksefidí y Ghoorchi [27] encontraron resultados similares al aplicar, en la dieta de pollos, un cultivo de *B. subtilis* con respuesta positiva en los ciclos de 1-21 días y de 22-42 días.

Conclusiones

Si se integran los indicadores evaluados (tamaño de la bolsa de Fabricio, bazo y títulos de HI) con la respuesta inmune como un índice de actividad probiótica, se puede concluir que existe una mejoría en la respuesta del sistema inmune de los pollos, con el empleo del concentrados de endosporas de la cepa de *B. subtilis* E-44 evaluado.

Referencias

1. Wilson GS, Hannu M, Hani EN. Probiotics and gut health: A special focus on liver diseases. *World J. Gastroenterol.* 2010; 16:403-10.
2. Furtula V, Jackson C, Farrell EG, Barrett J, Hiott LM, Chambers PA. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated from environmental samples in an area of intensive poultry production. *Int J Environ Res Public Health.* 2013; 10: 1020-36.
3. Huys G, Botteldoorn N, Delvigne F, De Vuyst L, Heyndrickx M, Pot B, Dubois JJ, Daube G. Microbial characterization of probiotics—Advisory report of the Working Group “8651 Probiotics” of the Belgian Superior Health Council (SHC). *Mol Nutr Food Res.* 2013; 57:1479-504.
4. Manzano C, Estupiñán D, Poveda E. Efectos clínicos de los probióticos: qué dice la evidencia. *Rev Chil Nutr.* 2012; 39:98-110.
5. Milian G, Rondón AJ, Pérez M, Bocourt R, Rodríguez Z, Ranilla MJ, Rodríguez M, Carro MD. Evaluation of *Bacillus subtilis* biopreparations as growth promoters in chickens. *Cuban J Agr Sci.* 2013; 47:61-7.
6. Pérez M, Bocourt R, Galindo J, Milian G, Alonso L, Piad R, Alfonso G. Isolation and selection of *Bacillus* sp. strains producing proteolytic enzymes. *Cuban J Agr. Sci.* 2000; 33:223-30.
7. Milián G, Rondón AJ, Pérez M, Samaniego LM, Riaño J, Bocourt R, Ranilla MJ, Carro MD, Rodríguez M, Laurencio M. Isolation and identification of strains of *Bacillus* spp. in different ecosystems, with probiotic purposes, and their use in animals. *Cuban J Agr Sci.* 2014; 48:347-51.
8. Duc LH, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70:2161-71.
9. Henderson G, Cox F, Kittelmann S, Miri VH, Zethof M, Noel SJ, Waghorn GC, Janssen PH. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. *PLoS ONE.* 2013; 8:e74787.
10. Casula G, Cutting SM. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68:2344-50.
11. Goto K, Omura T, Hara Y, Sadaie Y. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *J Gen Appl Microbiol.* 2000; 46:1-8.
12. GenBank con software BLAST. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Acceso 25 de junio 2007.
13. National Research Council. Nutrient Requirements of poultry. Washington. DC: National Academy Press; 1994.
14. Institute of Laboratory Animal Research. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eighth edition. Washington DC: National Academy Press; 2011. Disponible en: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>. Acceso 29 de julio 2015.
15. Kumprecht P, Zobac Z, Gasnarek Z, Rovosova E. The effect of continuous application of probiotics preparations based on *Saccharomyces cerevisiae* var. *Elipsoideus* and *Streptococcus faecium* C-68 (SF 68) on chicken broilers yield. *Zirociska Vyroba.* 1994; 5:491-503.
16. March BE, Billy J. Dietary modification of serum cholesterol in the chick. *J Nutr.* 1985; 89:105-10.
17. Duncan B. Multiple ranges and multiple F tests. *Biometrics.* 1955; 11:1-42
18. Suárez JE. Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutr Hosp.* 2013; 28 Suppl 1:S38-41.
19. Jadamus A, Vahjen W, Schafer K, Simon O. Influence of the probiotics strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the development of enterobacterial growth and on selected parameters of bacterial metabolism in digesta samples of piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2002; 86:42-54.
20. Hyronimus B, Le Marrec C, Sassi AH, Deschamps A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2000; 61:193-7.
21. Mantilla Lara C, Burgos Portacio A. Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. *Rev Colomb Biotecnol.* 2012; 14:31-40.
22. Salinas I, Cuesta A, Esteban MA, Meseguer J. Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii*

- and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. Fish Shellfish Immunol. 2005; 19:67-77.
23. Laurencio M, Pérez M, Piad R, Milián G, Rondón AJ, Díaz M. Actividad probiótica de una mezcla de exclusión competitiva en indicadores microbiológicos en pollos de ceba. Cienc Tecnol Aliment. 2009; 5:48-53.
 24. Giambrore J. Inmunosupresión en las aves. Causas y prevención. Avic Prof. 1996; 14:42-7.
 25. Edbauer C, Weinberg R, Taylor J, Senelonge AR, Bouquet JF. Protection of chickens with a recombinant fowlpoxvirus expressing the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuroaminidase gene. Virology. 1990; 179:901-4.
 26. Nakano T, Shimizu M, Fukushima M, Yumiyoshi S. Effects of a probiotic on the lipid metabolism of pullet hen as a cholesterol-enriched diet. Biotechnol Biochem. 1999; 63:1569-75.
 27. Khaksefidi A, Ghoorchi T. Effect of probiotics on performance and immunocompetence in broiler chicks. J Poultry Sci. 2006; 43:296-300.