

## Artículo científico

Selección e identificación de aislados de *Bacillus* spp. del tracto digestivo de pollos de traspatio, con potencial probióticoSelection and identification of *Bacillus* spp. isolates from the digestive tract of backyard chicken, with probiotic potential

Fátima Arteaga-Chávez<sup>1</sup>, Mario López-Vera<sup>1</sup>, Marta Laurencio-Silva<sup>2</sup>, Ana Rondón-Castillo<sup>2</sup>, Grethel Milián-Florido<sup>2</sup>, Vladimir Barrios-González<sup>3</sup> y Ramón Bocourt-Salabarría<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

Caleta, Diez de Agosto No.82 y Granda Centeno.Campus Politécnico

Sitio El Limón, Bolívar, Manabí.Ecuador

<sup>2</sup>Universidad de Matanzas. Matanzas, Cuba

<sup>3</sup>Universidad de León, Facultad de Veterinaria, León, España

<sup>4</sup>Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

Correo electrónico: fatimataespam@yahoo.es

## Resumen

Con el objetivo de obtener cepas de *Bacillus* spp. con actividad probiótica, se realizó la selección e identificación de aislados de ciego de pollos de traspatio (*Gallus gallus domesticus*). Para el aislamiento se empleó el método de diluciones seriadas y tratamiento térmico (71 °C), con la finalidad de eliminar las células en fase vegetativa y obtener las endosporas. La selección incluyó diferentes pruebas, tales como: resistencia a pH ácido (2) y a sales biliares (1,5 g.L<sup>-1</sup> de Ox-Bilis), actividad antimicrobiana frente a cepas de colección ATCC y otras no pertenecientes a colecciones oficiales, y resistencia a 14 tipos de antibióticos. Los datos se analizaron según diseño de clasificación simple y se procesaron en el programa estadístico INFOSTAT. La caracterización e identificación se desarrolló a través de pruebas bioquímicas y moleculares (PCR). Se obtuvieron 75 aislados de *Bacillus* spp., de las cuales solamente dos (20BP y 50BP) sobrevivieron a la acción del pH ácido y de sales biliares, presentaron actividad antimicrobiana frente a cepas patógenas y fueron sensibles a 14 antimicrobianos. Estos dos aislados, identificados como *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, mostraron potencial para ser utilizados como probióticos.

**Palabras clave:** sales biliares, tratamiento térmico, viabilidad.

## Abstract

In order to obtain *Bacillus* spp. strains with probiotic activity isolates, from the cecum of backyard chicken (*Gallus gallus domesticus*) were selected and identified. For the isolation the method of seriated dilutions and thermal treatment (71 °C) was used, for eliminating the cells in vegetative phase and obtaining the endospores. The selection included different tests, such as: resistance to acid pH (2) and to biliary salts (1,5 g.L<sup>-1</sup> of Ox-Bilis), antimicrobial activity against ATCC collection strains and others not belonging to official collections, and resistance to 14 antibiotic types. The data were analyzed according to simple classification design and were processed in the statistical program INFOSTAT. The characterization and identification were developed through biochemical and molecular tests (PCR). Seventy five isolates of *Bacillus* spp. were obtained from which only two (20 BP and 50 BP) survived the action of the acid pH and of biliary salts, showed antimicrobial activity against pathogen strains and were sensitive to 14 antibiotics. These two isolates, identified as *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, showed potential to be used as probiotics.

**Keywords:** biliary salts, thermal treatment, viability

## Introducción

En el cantón Bolívar de Manabí, Ecuador, existe una larga tradición en la producción de aves de traspatio (criollas), por ser parte de su cultura culinaria. Esta crianza se caracteriza por los bajos costos de inversión y la facilidad en su manejo, de ahí la importancia de mantener dicha producción a pequeña escala. Tal actividad fortalece el bienestar de

las familias campesinas, proporcionándoles productos de alto valor nutritivo como carne y huevos (Quintero *et al.*, 2012). Sin embargo, el porcentaje de mortalidad en los pollitos es alto, sobre todo en épocas de mucha lluvia y alta humedad. En este periodo las infecciones bacterianas aumentan en las aves domésticas, y disminuye la eficiencia con que estas digieren y absorben los alimentos (Narváez *et al.*, 2002).

Una vía para mejorar la salud de las aves es el uso de probióticos, ya que fortalecen el equilibrio de la microbiota intestinal, estimulan el sistema inmune, producen sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos e incrementan el rendimiento productivo de los animales (Fuller, 1989; Lourenco *et al.*, 2012; Menconi *et al.*, 2013). La elaboración de estos biopreparados biotecnológicos con cepas autóctonas constituye un reto en la actualidad, principalmente para países en vías de desarrollo como Ecuador, ya que los productos que se utilizan contienen cepas foráneas que en ocasiones no están correctamente identificadas o en las dosis indicadas.

Dentro de las especies de mayor interés se encuentran las del género *Bacillus*, que se utilizan ampliamente en la obtención de biopreparados probióticos. Sin embargo, es necesario realizar una adecuada selección e identificación de los aislados, de forma tal que los microorganismos que se empleen permanezcan en estado viable y en cantidades suficientes una vez que superen las barreras ácida y biliar, demuestren actividad antimicrobiana y resistencia a los antibióticos, y sean reconocidos como seguros (Rosmini *et al.*, 2004).

El objetivo de este estudio fue obtener cepas de *Bacillus* spp. con actividad probiótica, a partir de la selección e identificación de aislados procedentes del ciego de pollos de traspatio (*Gallus gallus domesticus*).

## Materiales y Métodos

### Aislamiento de *Bacillus* spp. y sus endosporas del contenido cecal de pollos de traspatio

**Material biológico.** Con el fin de obtener los aislados se sacrificaron cinco pollos de traspatio adultos, por el método de dislocación cervical (Sánchez, 1990). Para el aislamiento de las endosporas de *Bacillus* spp. se tomó 1 g de contenido cecal y se siguió la metodología de las diluciones seriadas (Stanier, 1996). Se realizaron diluciones en solución salina estéril (0,9 % de NaCl) hasta  $10^{-12}$ ; las tres últimas diluciones se sometieron a 71 °C en baño termostático (UNITRONIC 320 OR) durante cinco minutos para eliminar las células en fase vegetativa, según la metodología descrita por Pérez (2000). Posteriormente se inoculó 0,5 mL en la superficie del medio, en placas que contenían agar nutriente. La incubación se realizó a 37 °C durante 24 h (incubadora TermoScientific).

Se seleccionaron 75 colonias con diferentes características morfológicas y se sembraron en cuñas

de agar nutriente. Posteriormente se purificaron, según la técnica de siembra por estrías o agotamiento (Stanier, 1996).

**Pruebas preliminares.** Se realizó la tinción de Gram y tinción de endosporas, así como la prueba de la catalasa (Harrigan y McCance, 1968). Se seleccionaron todos los aislados que fueran bacilos Gram positivos con presencia de endosporas, catalasa positiva y crecimiento en aerobiosis.

### Supervivencia de las endosporas a pH ácido.

Los aislados seleccionados fueron sometidos a diferentes niveles de pH ácido. Se cultivaron durante 72 h a 37 °C en caldo nutriente a pH 7. Posteriormente se inocularon en erlenmeyers que contenían 50 mL de caldo nutriente, ajustado a pH 2 (con HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>) y cultivos controles con pH 7. Los cultivos se desarrollaron en zaranda termostática (UNITRONIC 320 OR) durante 3 h a 37 °C. Seguidamente, se prepararon diluciones (1:10) y se sembraron en placas con agar nutriente, las cuales se incubaron durante 24 h a 37 °C. Para realizar el conteo de las endosporas resistentes se tomaron muestras a las horas 0 y 3 de incubación, según la metodología de Refugio (2002). El porcentaje de resistencia a pH ácido se calculó por la ecuación de Kociubinski *et al.* (1999):

$$\% \text{ R pH ácido} = \left[ \frac{(\text{UFC.mL}^{-1})_{\text{caldo nutriente pH 2}}}{(\text{UFC.mL}^{-1})_{\text{caldo nutriente pH 7}}} \times 100 \right]$$

Por cada cultivo se realizaron tres repeticiones y se seleccionaron aquellos aislados con % R pH ácido  $\geq 60$  %.

### Supervivencia de las endosporas en sales

**biliares.** Los aislados que sobrevivieron a pH ácido fueron sometidos posteriormente a la acción de las sales biliares. Se siguió la metodología descrita por Refugio (2002) para el estudio de resistencia a pH ácido, con la diferencia que al medio de cultivo se le añadió 1,5 g.L<sup>-1</sup> de OX-Bilis. La tolerancia a las sales biliares se valoró a través del conteo de endosporas viables en agar nutriente (AN) a las horas 0 y 3. El porcentaje de resistencia a las sales biliares (% R SB) se determinó mediante la ecuación de Kociubinski *et al.* (1999):

$$\% \text{ R SB} = \left[ \frac{(\text{UFC.mL}^{-1})_{\text{agar nutriente + sales}}}{(\text{UFC.mL}^{-1})_{\text{agar nutriente sin sales}}} \times 100 \right]$$

Por cada aislado se realizaron tres repeticiones.

### Determinación de la actividad antimicrobiana.

Se empleó la técnica de difusión en agar propuesta por Chaveerach *et al.* (2004). Se tomaron 5 mL de los cultivos 20BP y 50BP en caldo nutriente a las 0, 4, 8 y 18 h y se centrifugaron a 15 000

rpm a 5 °C durante 10 min en centrifuga refrigerada (P-selecta-Mixtasel). Posteriormente se esterilizó el sobrenadante a través de filtros de acetato de celulosa con poros de 0,22 µm (Minisart, Sartorius 600 kPa max). Se utilizó el sobrenadante sin modificar para inocular los pocillos en placas de agar nutriente.

Cepas indicadoras:

**Grupo I.** Cepas de colección ATCC (American Type Culture Collection): *Staphylococcus aureus* (ATCC-29213), *Enterococcus faecalis* (ATCC-29212), *Escherichia coli* (ATCC-25922).

**Grupo II.** Otras cepas de referencia: *E. coli*, *Proteus*, *Salmonella*, aisladas de hígado de pollos de traspatio enfermos e identificadas en el laboratorio de microbiología de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Ecuador.

Las cepas indicadoras se cultivaron durante 18 h en caldo nutriente a 37 °C y se incubaron en zarama termostataada durante 18 h a 37 °C.

**Desarrollo de la técnica de difusión en agar.** De los cultivos de las cepas indicadoras se tomaron 200 µL, que se inocularon en tubos con 20 mL de agar nutriente (con 10 % de Ión-Agar, Oxoid). En cada placa que contenía las cepas indicadoras se abrieron pocillos de 5 mm de diámetro, en los que se depositaron 60 µL del sobrenadante de las cepas productoras; las placas se mantuvieron a 5 °C durante 4 h para una mejor difusión de las sustancias en el agar. Después se incubaron durante 24 h a 37 °C hasta detectar el crecimiento y la aparición de los halos de inhibición. El diámetro de los halos se midió con una regla milimetrada. A cada valor se le restó el diámetro de los pocillos (Chaveerach *et al.*, 2004).

**Determinación de la sensibilidad a los antibióticos.** La determinación de la sensibilidad de los aislados 20BP y 50BP a los diferentes antibióticos (NEO-SENSITABS™) se realizó por el método de difusión en discos (Bawer *et al.*, 1966). La sensibilidad se determinó por los halos de inhibición y la prueba se realizó por duplicado.

**Caracterización e identificación de las cepas de *Bacillus* seleccionadas**

**Capacidad de crecimiento a altas temperaturas, diferentes pH y concentraciones salinas.** Los aislados se inocularon en erlenmeyers de 50 mL, a partir de un cultivo de 18 h a 37 °C en caldo nutriente, y se incubaron a 45, 50 y 65 °C (Beat-

le y Willians, 1996). Se procedió de igual manera para determinar el crecimiento a diferentes niveles de pH, para lo cual se ajustó el medio a pH 6, 7 y 8. También se evaluó la capacidad de crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl: 3, 5 y 7 % (Fields, 1978). En todos los casos los aislados se cultivaron durante 18 h y seguidamente se procedió a la medición de la densidad óptica ( $DO$ ,  $A_{600\text{ nm}}$ ) en espectrofotómetro (Jenway 6305).

**Determinación de los perfiles de fermentación de carbohidratos.** Se inocularon cultivos de los aislados en caldo nutriente y se incubaron a 37 °C durante 18 h. Seguidamente se centrifugaron y lavaron con solución salina al 0,9 %. A partir de este momento, se emplearon los API 50 CHB Medium y las Galerías API 50 CH (BioMérieux, S. A., France). La identificación de los aislados se llevó a cabo mediante la utilización del Apilab Plus Software, versión 3.3.3.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** La PCR se realizó a los aislados seleccionados como candidatos a probióticos. Para ello, las bacterias se cultivaron por agotamiento en agar nutriente a 37 °C durante 24 h. A partir de la obtención de las colonias puras se siguió el siguiente protocolo:

**Extracción de ADN.** Se tomaron dos colonias bien definidas por cada cultivo fresco de 18-24 h, se resuspendieron en 100 µL de buffer de Lisis y se agregó 1 µL de proteinasa K (PK) a razón de 0,015 mg.µL<sup>-1</sup>; se incubó a 52 °C durante 60 min en Thermomixer (Eppendorf). Seguidamente, se realizó lisis e inactivación de la PK por cocción a 98 °C durante 10 min. Se centrifugaron los Eppendorf durante 10 min a 16 000 rpm. Con el sobrenadante se preparó la PCR.

**Amplificación de ADN.** Se realizó la PCR en un termociclador (Mastercycler gradient®, Eppendorf, Netheler, Hinz GmbH, Hamburg, Germany) en el que se colocaron las muestras y se sometieron al siguiente programa: proceso de desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C y 30 s a 72 °C. El proceso finalizó con 5 min de incubación a 72 °C (Greisen *et al.*, 1994).

Como control positivo se utilizó una cepa de *Bacillus subtilis* ATCC-ER229 y un control negativo que presentaba todos los componentes de la PCR (tabla 1), pero sin ADN molde.

Con el fin de comprobar la amplificación del ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1,5 %) de los productos de la PCR. Cada po-

Tabla 1. Componentes de la PCR.

Componente (concentración)	Volumen (μL)
H <sub>2</sub> O Bidestilada	34,1
Tampón	5
MgCl <sub>2</sub> (2 mM)	2,5
DNTPs (0,2 mM) (10 mM/mL)	2
Cebadores 16S (0,5 μ M) (10 mM/mL)	2,5
Cebadores 23S (0,5 μ M) (10 mM/mL)	2,5
Taq ADN polimerasa (10 U/reacción) (50 M)	0,4
ADN (1 μL/reacción) (100-400 ng)	1
Volumen total/reacción	50

DNTP: desoxirribonucleótido trifosfato.

cillo se cargó con 8 μL de la muestra y 2 μL de tampón de carga a base de azul de bromofenol 0,25 % (p/v), glicerol 50 %, EDTA 1 mM y xilencianol 0,5 % (p/v). Se utilizó además un marcador molecular (Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder plus, MBI Fermentas).

El ADN de cada aislado se amplificó con los cebadores específicos (Goto *et al.*, 2000): 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCC TAA TAC ATG CAA GTC GAG CG-3' y 5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT- 3'.

**Purificación y secuenciación.** El ADN amplificado se purificó a partir de una banda que se extrajo del gel de agarosa de 600 pares de bases. Seguidamente, se realizó una nueva PCR y el producto de la reacción, después de la purificación y la amplificación, se sometió a una nueva electroforesis para comprobar su calidad. La secuenciación de las muestras se realizó en la Universidad de León, España, con un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem).

Se tomó un fragmento de ADN amplificado por PCR a partir del ADN genómico de los aislados que se evaluaron. Las secuencias se compararon con la base de datos internacional de la colección de nucleótidos no redundantes (nr/nt) del GenBank+EMBL+DDBJ+secuencias PDB, mediante el software BLASTN 2.2.19 (Stephen *et al.*, 1997) que se encuentra en la página web del NCBI (National Center of Biological Information).

**Análisis estadístico.** El diseño fue de clasificación simple y se empleó el programa estadístico INFOTAT, versión 1.0 (Balzarini *et al.*, 2001). En los casos necesarios, se utilizó la dócima de Duncan (1955) para la comparación entre medias. Los datos representaron los valores medios de tres repeticiones por experimento.

## Resultados y Discusión

Se obtuvieron 75 aislados de ciego de pollos de traspatio. De ellos, 27 presentaron características de *Bacillus* tales como: bacilos Gram-positivos, catalasa positiva y crecimiento en aerobiosis. Se observó, además, la presencia de endosporas, lo cual coincide con lo descrito por Mayea *et al.* (1997) y Juárez *et al.* (2010) para este género.

Las bacterias del género *Bacillus* llegan de forma natural al tracto gastrointestinal de las aves a través de los alimentos (Calvo y Zúñiga, 2010). Además, en la naturaleza se encuentran en el suelo, en el agua y en otros ambientes, incluido el intestino del hombre (Barrios, 2013).

En la tabla 2 se muestra el comportamiento de las 27 cepas que se evaluaron en presencia de pH ácido y sales biliares. Todos los aislados sobrevivieron a pH ácido; sin embargo, solamente nueve superaron el 60 % de resistencia, los cuales fueron seleccionados.

Investigaciones realizadas por Milián (2009) demostraron que estos microorganismos esporulados se encuentran en conteos de 10<sup>9</sup> a 10<sup>10</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de contenido cecal en pollos de ceba. También Yegani (2010) y Aguavil (2012) aislaron cepas de *Bacillus* spp. del contenido del íleon y del ciego de pollos Broiler Ross-308, las cuales se utilizaron como probióticos con buenos resultados.

En la tabla 3 se presentan los porcentajes de resistencia de los aislados ante la acción de las sales biliares. Esta condición influyó negativamente en la viabilidad de las células, ya que solo dos aislados (20BP y 50BP) mostraron capacidad de resistencia a esta barrera gástrica.

Las endosporas de algunas cepas de *Bacillus* tienen la capacidad de soportar pH ácidos y descargas biliares en su paso a través del tracto gastrointestinal de los animales (Milián, 2009). Los



Tabla 2. Aislados resistentes a pH 2 durante tres horas.

Aislado	% resistencia a pH 2	DE %	CV %
2 BP	32,45	0,56	0,46
3 BP	33,71	0,96	1,94
4 BP	30,22	0,78	1,26
5 BP	45,52	0,65	0,86
6 BP	59,24	0,67	0,72
7 BP	49,78	0,68	0,51
8 BP	51,45	0,62	0,48
10 BP	57,78	0,25	0,07
12 BP	33,28	0,29	0,10
15 BP	39,58	0,58	0,52
19 BP	51,33	0,48	0,53
20 BP	99,92	0,51	0,63
23 BP	48,23	0,32	0,15
27 BP	52,84	0,84	0,96
28 BP	55,23	1,29	1,95
29 BP	44,88	0,61	0,88
36 BP	97,51	0,79	1,47
41 BP	42,58	0,53	0,65
44 BP	98,76	0,39	0,34
45 BP	30,93	1,10	1,71
48 BP	98,71	0,49	0,58
50 BP	99,33	0,59	0,73
52 BP	97,52	0,51	0,59
53 BP	98,13	0,73	1,23
54 BP	97,78	1,02	2,09
55 BP	97,53	0,80	1,45
56 BP	49,56	0,55	0,44

microorganismos que se seleccionen con estos fines deben sobrevivir a la barrera gástrica para que puedan alcanzar las partes bajas del tracto donde van a desarrollar su acción probiótica. Overland *et al.* (2003) refirieron que los microorganismos que se empleen deben resistir niveles bajos de pH, ya que se someten a la acción de los ácidos del estómago durante su tránsito por el tracto digestivo, donde el pH puede alcanzar valores muy bajos.

Milián (2009), al evaluar cepas de *Bacillus* spp. aisladas de diferentes ambientes, obtuvo que el 33 % mostró capacidad para resistir pH ácidos y solo dos cepas (C34 y C31) sobrevivieron ante la presencia de las sales biliares en esta misma concentración. Sin embargo, Barbosa *et al.* (2005)

Tabla 3. Resistencia de los aislados a la acción de las sales biliares.

Aislado	% resistencia a sales biliares	DE %	CV %
20 BP	97,30	0,62	0,95
36 BP	-	-	-
44 BP	-	-	-
48 BP	-	-	-
50 BP	96,78	0,53	0,31
52 BP	-	-	-
53 BP	-	-	-
54 BP	-	-	-
55 BP	-	-	-

aislaron 259 cepas de *Bacillus* del tracto gastrointestinal de pollos y solo el 7 % de estas resistieron la barrera ácida en condiciones de laboratorio. Otros trabajos refieren que la germinación de las endosporas se afecta por la presencia de las sales biliares en un 20-25 % (Duc *et al.*, 2005).

Se conoce que a pH 2 muchas cepas disminuyen sustancialmente su viabilidad (Milián *et al.*, 2014), por lo que en los aislados que se evaluaron a este pH se presentó un obstáculo de sobrevivencia sumamente drástico para las células bacterianas. No obstante, este constituye un criterio de selección importante si se toma en cuenta el hecho de que el jugo gástrico de los pollos y patos puede llegar a valores tan bajos de pH como 0,5-2 (Lara y Burgos, 2012).

Las sales biliares actúan como detergente y desestabilizan los lípidos presentes en la membrana citoplasmática. Esta situación trae como consecuencia la formación de poros que perturban la integridad y la fisiología de las células, lo cual puede provocar la muerte (Lara y Burgos, 2012). A partir de estos resultados se infiere que los aislados que se evaluaron pueden considerarse potencialmente probióticos, ya que podrían transitar el tracto digestivo de las aves y facilitarían de este modo la colonización de este ecosistema.

Los dos aislados que sobrevivieron a la concentración de sales biliares (20BP y 50BP) resultaron bacilos Gram positivos, con presencia de endosporas ovaladas y ubicadas centralmente. Las colonias presentaron forma irregular, de color crema, con bordes ondulados, estructura interna opaca y elevación convexa.

Entre 0 y 4 h no se observó actividad antimicrobiana (tabla 4) frente a las cepas indicadoras; sin

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los aislados.

Cepa indicadora	Halo de inhibición (mm)	
	20BP	50BP
8 h		
<i>S. aureus</i> ATCC-29213	4,43 <sup>a</sup>	6,27 <sup>a</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC-29212	4,33 <sup>a</sup>	5,23 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> ATCC-25922	8,43 <sup>b</sup>	9,20 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i> spp.	11,40 <sup>e</sup>	11,17 <sup>c</sup>
<i>Proteus</i> spp.	9,40 <sup>c</sup>	9,53 <sup>b</sup>
<i>Salmonella</i> spp.	10,33 <sup>d</sup>	10,37 <sup>bc</sup>
P	< 0,001	< 0,001
EE	0,04	0,41
18 h		
<i>S. aureus</i> ATCC-29213	9,76 <sup>b</sup>	9,66 <sup>a</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC-29212	7,52 <sup>a</sup>	8,28 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> ATCC-25922	10,66 <sup>bc</sup>	10,10 <sup>ab</sup>
<i>E. coli</i> spp.	13,76 <sup>c</sup>	13,59 <sup>c</sup>
<i>Proteus</i> spp.	11,60 <sup>cd</sup>	11,40 <sup>abc</sup>
<i>Salmonella</i> spp.	12,13 <sup>d</sup>	12,84 <sup>bc</sup>
P	< 0,001	< 0,05
EE	0,45	1,01

p: probabilidad, EE: error estándar. a, b, c, d, e: medias con letras diferentes dentro de cada columna difieren para  $p < 0,001$  (Duncan, 1955).

embargo, a partir de las 8 hasta las 18 h aparecieron halos de inhibición en todas las cepas y se manifestaron diferencias ( $p < 0,001$ ) en el diámetro de estos, debido a la incidencia de las sustancias antimicrobianas. El mayor halo de inhibición en las cepas ATCC indicadoras se produjo en la cepa de *E. coli* a las 8 y 18 h, seguida de *E. faecalis* y *S. aureus*. También coincide que dentro de las cepas de referencia, el cultivo de *E. coli* manifestó el mayor halo de inhibición, seguido por *Salmonella* y *Proteus*.

Se conoce que durante las primeras semanas de vida de las aves de granja y traspatio el principal agente causal de las enfermedades diarreicas es *E. coli*, y aproximadamente el 70 % de las micosis respiratorias en pollitos se acompañan de infecciones por enterobacterias, en las que se destaca la presencia de este germen como el microorganismo comúnmente más aislado (Pérez *et al.*, 2011).

Milián (2009) evaluó tres cepas de *Bacillus* (C-31, C-34 y E-44), y estas fueron capaces de producir sustancias antimicrobianas que inhibieron totalmente a cepas indicadoras tales como: *Aerobacter*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Listeria inocua*,

*L. monocytogenes*, *S. aureus* 29737, *Klebsiella* 130300, *S. epidermidis* 12228 y *P. vulgaris* 13315.

Laurencio (2010) informó que una mezcla de exclusión competitiva a base de *Bacillus* spp. y *Lactobacillus* frente a enteropatógenos inhibía a *E. coli* entre 12 y 24 h. Tales resultados son similares a los de este estudio, lo cual demuestra que la producción de sustancias antimicrobianas se produjo en la fase logarítmica del crecimiento del cultivo.

Los aislados 20BP y 50BP fueron sensibles a los 14 antibióticos evaluados (tabla 5). Estos resultados son similares a los reportados por Milián (2009), quien evaluó tres cepas de *Bacillus* con 25 antibióticos y todas fueron sensibles. Ello indica que estas cepas pudieran no presentar plásmidos de resistencia; de ahí la importancia de utilizar pollos de traspatio para el aislamiento de las cepas, ya que estos animales usualmente no son tratados con antibióticos. Existe la creencia de que tanto los cultivos iniciadores para la elaboración de alimentos, como las bacterias que se usan con fines probióticos, sirven como hospederos de genes de resistencia a los antibióticos, los cuales pudieran transferirse a las bacterias patógenas del hombre y los animales (Danielsen y Wind, 2003; Alvarado *et al.*, 2007).

Tabla 5. Resistencia a diferentes antibióticos

Antibiótico (μg)	Cepa	
	20BP	50BP
Kanamicina 100	s	s
Amikacina 300	s	s
Ampicilina 33	s	s
Acitromicina 15	s	s
Eritromicina 200	s	s
Amoxicilina 30	s	s
Ciprofloxacina 0,5	s	s
Estreptomicina 100	s	s
Vancomicina 5	s	s
Apramicina 40	s	s
Bacitracina 40	s	s
Neomicina 120	s	s
Lincomicina 19	s	s
Espectinomicina 200	s	s

s: sensible

En la tabla 6 se muestra el crecimiento de los aislados en condiciones adversas. Se comprobó que estos aislados tuvieron la capacidad de crecer en ese rango de pH y a altas temperaturas. De igual manera se demostró que fueron tolerantes a las diferentes concentraciones de NaCl, y no hubo diferencias entre ellos.

El crecimiento de los aislados a altas temperaturas, además de tener valor taxonómico, demostró la capacidad de estos microorganismos para crecer en condiciones extremas. Las bacterias que presentan estas características manifiestan mayor capacidad de crecimiento y pueden proliferar en

el tracto gastrointestinal, donde la temperatura es superior a los 37 °C (Salminen *et al.*, 1996). El hecho de que crezcan a temperaturas superiores a los 50 °C significa que son termófilas, por lo que se puede inferir que los aislados deben ser termoes- tables y permanecer viables sin afectaciones fisiológicas negativas. Ello facilita su utilización en procedimientos tecnológicos en los que se apliquen altas temperaturas.

Los perfiles de fermentación de carbohidratos se muestran en la tabla 7; los aislados presentaron igual perfil de fermentación ante los diferentes azúcares.

Las bacterias de esta especie se consideran microorganismos «generalmente reconocidos como seguros» (GRAS), según el criterio de la Association of American Feed Control Officials y la Food and Drug Administration (Anon, 1998). En la actualidad esta especie, junto con las bacterias del género *Lactobacillus*, son las que más se emplean en la obtención de biopreparados probióticos, con efectos beneficiosos en la producción de animales monogástricos (Rondón, 2009).

Los alineamientos de la secuencia del segmento de ADNr 16S de ambos aislados con secuencias depositadas en el GenBank se muestran en la tabla 8. La identificación por técnicas moleculares permitió confirmar los resultados de los perfiles de fermentación de carbohidratos. Al mostrar un perfil similar y coincidente con la base de datos internacional de la colección de nucleótidos no redundantes, estos aislados (20BP y 50BP) se reafirmaron como pertenecientes a *Bacillus subtilis* en un 99 %. Ello confirma la seguridad biológica de los aislados que se identificaron para su posible uso en la elaboración de este tipo de aditivo.

Tabla 6. Capacidad de crecimiento de los aislados en condiciones adversas.

Indicador		Crecimiento (DO)						p
		20BP	DE	CV	50BP	DE	CV	
pH	6	1,65	0,10	0,15	1,78	0,10	0,13	≥ 0,05
	7	1,89	0,09	0,12	1,93	0,07	0,06	
	8	1,43	0,07	0,07	1,31	0,19	0,46	
Temperatura (°C)	45	1,87	0,12	0,24	1,86	0,16	0,34	
	50	1,77	0,04	0,03	1,75	0,10	0,17	
	65	1,79	0,09	0,13	1,80	0,13	0,29	
NaCl (%)	3	1,33	0,10	0,15	1,31	0,21	0,73	
	5	1,27	0,07	0,08	1,53	0,12	0,21	
	7	1,12	0,08	0,13	1,15	0,26	1,09	

DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

Tabla 7. Perfiles de fermentación de carbohidratos.

Azúcares	Aislado		Azúcares	Aislado	
	20 BP	50 BP		20 BP	50 BP
Control	-	-	Arbutina	+	+
Glicerol	+	+	Esculina	+	+
Eritritol	-	-	Salicina	+	+
D-arabinosa	-	-	Celobiosa	+	+
L-arabinosa	+	+	Maltosa	+	+
Ribosa	+	+	Lactosa	+	+
D-xilosa	+	+	Melibiosa	+	+
L-xilosa	-	-	Sacarosa	+	+
Adonitol	-	-	Trehalosa	+	+
a-metil-D-xilosida	-	-	Inulina	-	-
Galactosa	-	-	Melezitosa	-	-
D-glucosa	+	+	D-rafinosa	+	+
D-fructosa	+	+	Almidón	+	+
D-manosa	+	+	Glucógeno	+	+
L-sorbosa	-	-	Xilitol	-	-
Ramnosa	-	-	a-gentobiosa	-	-
Dulcitol	-	-	D-turanosa	-	-
Inositol	+	+	D-lixosa	-	-
Manitol	+	+	D-tagatosa	-	-
Sorbitol	+	+	D-fucosa	-	-
$\alpha$ -metil-D-mannoside	-	-	L-fucosa	-	-
$\alpha$ -metil-D-glucoside	+	+	D-arabitol	-	-
N-acetil-glucosamina	-	-	L-arabitol	-	-
Amigdalina	+	+			

+: reacción positiva, -: reacción negativa

En la figura 1 se muestran los árboles filogenéticos de los dos aislados, donde se confirma la homología que se establece entre las secuencias obtenidas, con otras depositadas en la base de datos.

Los resultados del presente estudio coinciden con los de Calvo y Zúñiga (2010), quienes aislaron cepas de *Bacillus* de pollos de ceba y caracterizaron la microbiota perteneciente a este género. También coinciden con los informados por Milián *et al.* (2014) al evaluar 48 cepas de *Bacillus* spp.

## Conclusiones

Los aislados 20BP y 50BP, procedentes del tracto digestivo de pollos de traspatio y que se identificaron como *B. subtilis* subespecie *subtilis*, demostraron características potenciales para emplearse como candidatos a probióticos.

## Referencias bibliográficas

- Aguavil, J. C. *Evaluación del efecto de un probiótico nativo elaborado a base de Lactobacillus acidophilus y Bacillus subtilis sobre el sistema gastrointestinal en pollos Broiler Ross-308 en Santo Domingo de las Tsáchilas*. Tesis presentada en opción al título de Máster. Ecuador: ESPE, 2012.
- Alvarado, C.; Chacón, Z.; Rojas, J. O.; Guerrero, B. & López, G. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas de un queso artesanal. Su uso como cultivo iniciador. *Rev. Cient. FCV-LUZ*. 17 (3):301-308, 2007.
- Balzarini, Mónica G.; Casanoves, F.; Di Rienzo, J. A.; González, Laura A. & Robledo, C. *Infostat software estadístico. Manual del usuario*. Versión 1. Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, 2001.



Tabla 8. Alineamientos de las cepas.

16S DNAr <i>Bacillus subtilis</i> subsp <i>subtilis</i> 20BP
CTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGT- GAGCCGTTACCT
CTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGT- GAGCCGTTACCT
CACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAAC- CATGCGGTTCAAA
CACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAAC- CATGCGGTTCAAA
CAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGT- TACTACCCGTCCTG
CAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGT- TACTACCCGTCCTG
16S DNAr <i>Bacillus subtilis</i> subsp <i>subtilis</i> 50BP
GGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGA- GCCGTTACCTCA
GGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGA- GCCGTTACCTCA
CCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAAC- CATGCGGTTCAAACA
CCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAAC- CATGCGGTTCAAACA
ACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACT- CACCCGTCCTG
ACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACT- CACCCGTCCTG

- Barbosa, Teresa M.; Serra, Cláudia R.; La Ragione, R. M.; Woodward, M. J. & Henriques, A. O. Screening for *Bacillus* isolates in the broilers gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microb.* 71 (2):968-978, 2005.
- Barrios, V. Memorias. *Taller-Seminario Internacional sobre Biología Molecular Aplicada*. [CD-ROM], 2013.
- Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherris, J. C. & Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45 (4):493-496, 1966.
- Calvo, Pamela & Zúñiga, Doris. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*. 9 (1):31-39, 2010.
- Chaveerach, P.; Lipman, L. J. & van Knape, F. Antagonistic activities of several bacteria on *in vitro* growth of 10 strains of *Campylobacter jejuni/coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 90 (1):43-50, 2004.
- Danielsen, M. & Wind, A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82 (1):1-11, 2003.
- Duc, L. H.; Hong, H. A. & Cutting, S. M. Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery. *Appl. Environ. Microb.* 21 (27-30):4215-4224, 2003.
- Duncan, D. B. Multiple range and multiple F. test. *Biometrics*. 11 (1):1-42, 1955.
- Fields, Marion. *Método para el estudio de las bacterias esporuladas termófilas de interés en las industrias alimentarias y sanitarias*. Zaragoza, España: Editorial Acribia, 1978.
- Fuller, R. Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* 66 (5):365-378, 1989.

- 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.* 46 (1):1-8, 2000.
- Greisen, K.; Loeffelholz, M.; Purohit, A. & D., Leong. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 32 (2):335-351, 1994.
- Harrigan, W. F. & McCance, Margaret E. *Métodos de laboratorio de Microbiología*. León, España: Editorial Academia, 1968.
- Juárez-Caratechea, A.; Gutiérrez-Vázquez, Ernestina; Segura-Correa, J. & Santos-Ricalde, R. Calidad del huevo de gallinas criollas criadas en traspatio en Michoacán, México. *Trop. Subtrop. Agroecosys.* 12:109-115, 2010.
- Kociubinski, G.; Pérez, P. & De Antoni, G. Screening of bile resistance and bile of precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J. Food Protect.* 62 (8):905-912, 1999.
- Lara, Cecilia & Burgos, Ángela. Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 14 (1):31-40, 2012.
- Laurencio, Marta. *Obtención y caracterización de una mezcla de exclusión competitiva de microorganismos fecales de pollos de ceba y su evaluación in vivo de su efecto probiótico*. Tesis presentada en opción al título académico de Master en Producción Animal para la zona tropical. San José de las Lajas, Cuba: Instituto de Ciencia Animal, 2010.
- Lourenco, Mariana C.; Kuritza, L. N.; Westphal, P.; Muniz, E.; Pickler, Larissa & Santin, Elizabeth. Effects of *Bacillus subtilis* in the dynamics of infiltration of immunological cells in the intestinal mucosa of chickens challenged with *Salmonella*. *Int. J. Poult. Sci.* 11 (10):630-634, 2012.
- Mayea, S.; Carone, M. D.; Novo, R.; Sardiñas, B. I.; Silveira, E. P.; Arteaga, M. S. *et al. Microbiología agropecuaria*. Tomo. 1. Editorial Félix Varela, La Habana. 1997.
- Menconi, Anita; Morgan, Marion J.; Pumford, N. R.; Hargis, B. M. & Tellez, G. Physiological properties and *Salmonella* growth inhibition of probiotic *Bacillus* strains isolated from environmental and poultry sources. *Int. J. Bacteriol.* 2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4745483/pdf/IJB2013-958408.pdf>, 2013.
- Milián, Grethel. *Obtención de cultivos de Bacillus spp. y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (Gallus gallus domesticus)*. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. San José de las Lajas, Cuba: Instituto de Ciencia Animal, 2009.
- Milián, Grethel; Rondón, A. J.; Pérez, M.; Samaniego, L. M.; Riaño, J.; Bocourt, R. *et al.* Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus* spp. en diferentes ecosistemas con fines probióticos. Su utilización en animales. *Rev. cubana Cienc. agric.* 48 (4):347-351, 2014.
- Narváez, S. & Oñate, G. *Perfil de proyecto de fortalecimiento de avicultura rural en Ecuador*. Quito: Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2002.
- Overland, M.; Kjeldsen, K. C. & Granlit, T. Antimicrobial properties of potassium diformate in pigs. *Feed Tech.* 7 (6), 2003.
- Pérez, M. *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. San José de las Lajas, Universidad Agraria de La Habana, 2000.
- Pérez, M.; Laurencio, Marta; Rondón, Ana J.; Milián, G.; Bocourt, R. & Arteaga, Fátima. Actividad antimicrobiana de una mezcla probiótica de exclusión competitiva y su estabilidad en el tiempo. *Rev. Salud Anim.* 33 (3):147-153, 2011.
- Quintero, M.; Montoya, O. & Gutiérrez, P. Purificación de una alfa amilasa producida por la cepa nativa de *Bacillus* sp. *DYNA.* 77 (162). <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/>, 2012.
- Refugio, T. V. Flora intestinal, probióticos y salud. *VII Taller Internacional sobre calidad sanitaria. Evaluación y conservación de alimentos*. La Habana, 2002.
- Rondón, Ana J. *Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación de su efecto probiótico en estos animales*. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, 2009.
- Rosmini, M. R.; Sequeira, G. J.; Guerrero-Legarreta, I.; Martí, L. E.; Dalla-Santina, R.; Frizzo, L. *et al.* Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 3 (2):181-191, 2004.
- Salminen, S.; Isolauri, E. & Salminen, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Anton. Leew. Int. J. G.* 70 ((2-4)):347-358, 1996.
- Sánchez, A. *Enfermedades de las aves*. La Habana: ENPES, 1990.
- Stanier, R. S. *Microbiología*. 2 ed. Barcelona: Editorial Reverté, 1996.
- Stephen, F.; Altschul, L.; Madden, A.; Schäffer, J. Z.; Zhang, W.; Miller *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997.
- Yegani, M. *Manipulación de la flora Intestinal en aves*. Canadá: Universidad de Alberta, 2010.