

SIMPOSIO NO. 1 CIENCIA Y TÉCNICA

TEMA: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROBIÓTICA DE UN BIOPREPARADO A BASE DE *BACILLUS SUBTILIS* Y SUS ENDOSPORAS EN POLLOS DE ENGORDE

Autores: Fátima Arteaga Chávez*, Juan Sergio Molina Álvarez, Diego Jamil Sambrano Lucas, Marta Laurencio Silva, Mario López Vera Grethel Milián Florido, Ana Julia Rondón Castillo y Manuel Pérez Quintana.

El tracto gastrointestinal (TGI) de las aves presenta entre 300 y 500 especies diferentes de bacterias. Se estima que existen 10 veces más células bacterianas en ese ecosistema que células somáticas en el cuerpo animal (Conway *et al.* 1987, Ferreira 2003, Le H Duc *et al.* 2004). Estas bacterias se distribuyen por todo el intestino, pero la mayor concentración y actividad metabólica se encuentra en los ciegos. La población microbiana varía desde 10^3 UFC.g⁻¹ en el estómago, hasta 10^{14} UFC.g⁻¹ en el intestino grueso distal (Garlich 1999, Apajalahti *et al.* 2004). Las aves presentan, además, elevada población microbiana en el buche, con predominio de cepas de *Lactobacillus* spp (Fuller 1977).

Debido a que la producción intensiva aviar implica la no presencia de la madre junto al pollito en el momento de la eclosión y la posible contaminación con entero patógenos que afectan a los indicadores productivos y de salud, se justifica el empleo de probióticos desde el primer día de edad de las aves.

En Ecuador, el uso indiscriminado de antibióticos en los animales como aditivos promotores del crecimiento, ejerce una acción negativa en la conservación de microorganismos benéficos en el tracto gastrointestinal, lo que conlleva a un desbalance de la microflora natural. Éste empleo de antibióticos en dosis subterapéuticas en el alimento de aves, mejora su desempeño y disminuye la morbilidad. Sin embargo, existe el riesgo de potencial desarrollo de resistencia bacteriana al antibiótico (Buchanan *et al.*, 2008)

El uso de biopreparados probióticos contribuye a modificar la comunidad microbiana de bacterias patógenas a no patógenas, a nivel intestinal. Los

probióticos son bacterias vivas beneficiosas crecidas en el laboratorio y suministradas con el alimento. Estos biopreparados se emplean para mejorar la salud del tracto gastrointestinal y sólo son efectivas cuando sus necesidades nutricionales para el crecimiento son cubiertas (Ferreira y Teshima 2000, Barbosa *et al.* 2005).

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto probiótico de un biopreparados a base de *Bacillus subtilis* y sus endosporas sobre indicadores inmunológicos, microbiológicos, productivos y de salud en pollos de ceba.

Materiales y Métodos

Elaboración del Biopreparado. Se obtuvo a partir del crecimiento de un cultivo de *Bacillus subtilis* en un medio estandarizado informado por Pérez (2000).

Procedimiento Experimental. Se utilizaron 400 pollos de ceba del híbrido comercial ROSS 308, de un día de edad, distribuidas en cuatro grupos experimentales de 100 aves cada uno, según diseño completamente aleatorizado. Se hicieron cuatro repeticiones de 25 animales por tratamiento. Los tratamientos utilizados fueron: T1 (control sin biopreparado); 0.5; 1.0 y 1.5 mL del biopreparado por litro de agua en los tratamientos T2, T3 y T4, respectivamente. El experimento se desarrolló en el Barrio San Lorenzo de la ciudad de Calceta, Cantón Bolívar. La crianza fue en piso con camada de paja de arroz. El sistema de alimentación fue *ad libitum*, con un concentrado de inicio de 0 a 28 días, y otro de finalización de 29 a 45 días. Los mismos estaban basados en una dieta de maíz-soya, según los requerimientos del NRC (1994).

Las aves se sometieron a las mismas condiciones experimentales durante el ciclo de vida de 42 días con tres momentos de muestreo (25, 35 y 42 días).

Esquema de vacunación

Se siguió el esquema de vacunación siguiente: el primer día de edad Marek, viruela aviar, bronquitis infecciosa, primera dosis de Gumboro. A los siete días

la segunda dosis de Gumboro. A los 14 días Newcastle y a los 21 la tercera dosis de Gumboro.

Procedimiento experimental para el análisis de las muestras

Para determinar *in vivo* el efecto probiótico se seleccionaron y sacrificaron diez 4 animales por tratamiento en cada muestreo. La selección se realizó sobre la base del peso promedio de cada grupo de aves, en un rango de $\pm 10\%$. El procedimiento para evaluar la actividad biológica del biopreparado se describe a continuación:

Indicadores microbiológicos

Toma de muestras: A los 25, 35 y 42 días se tomaron muestras del contenido cecal (10 g) de 10 pollos por tratamiento. Las mismas se homogenizaron en 90 mL de agua peptonada para *Lactobacillus* y en SSE para los demás grupos microbianos.

Medios selectivos: Para realizar el conteo de los diferentes grupos microbianos en los ciegos de los pollos, se emplearon diferentes medios selectivos. En el caso de los anaerobios totales se utilizó Agar nutriente (MERCK); endosporas de *Bacillus* spp en Agar-nutriente, coliformes Agar Macconkey (MERCK); *Lactobacillus* Agar MRS (MERCK); *Bacillus* spp Agar Nutriente (MERCK).

Para efectuar el conteo de los diferentes grupos microbianos se realizaron diluciones seriadas de las muestras del contenido cecal de los pollos, en una relación de 1:10 (v/v), en agua de peptona para los *Lactobacillus* y en SSE para los demás grupos microbianos. Para coliformes se hicieron diluciones 10^{-1} hasta 10^{-6} , para los grupos de *Bacillus* y anaerobios totales las diluciones fueron desde 10^{-1} hasta 10^{-12} , para *Lactobacillus* desde 10^{-1} hasta 10^{-11} , para endosporas de *Bacillus* spp hasta 10^{-8} .

Determinación del pH

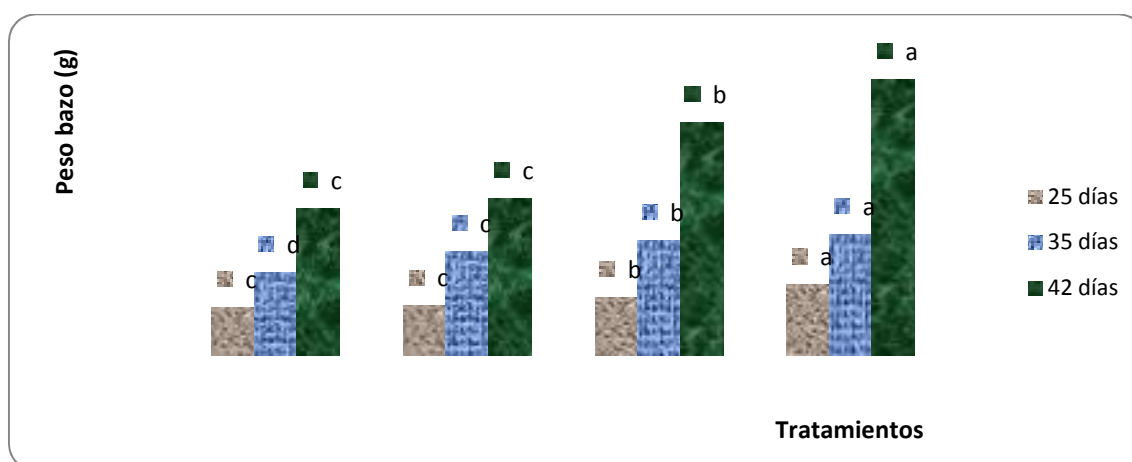
Durante los muestreos a los 25, 35 y 42 días se tomaron muestras de 1 g de contenido cecal y se diluyeron en 10 mL de agua destilada y se agitaron, procediéndose entonces a su lectura en un pH metro digital (BasiC20.Crison).

Procesamiento estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el sistema Stargraph versión 5,0. Los análisis de varianza se realizaron para verificar diferencias significativas entre las medias, con un nivel de significación de $P < 0,05$. La prueba de Duncan (1955) se usó para realizar las comparaciones múltiples entre las medias. Los conteos de microorganismos viables se transformaron a Log N, para garantizar las condiciones de normalidad en la curva de crecimiento. Para el análisis, se aplicó la fórmula $(K+N) \cdot 10^X$, donde K es la constante que representa el logaritmo de la dilución en la cual se inoculó el microorganismo; N es el logaritmo del número de UFC determinado; 10 es la base de los logaritmos y X es la dilución a la cual se efectuó la inoculación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

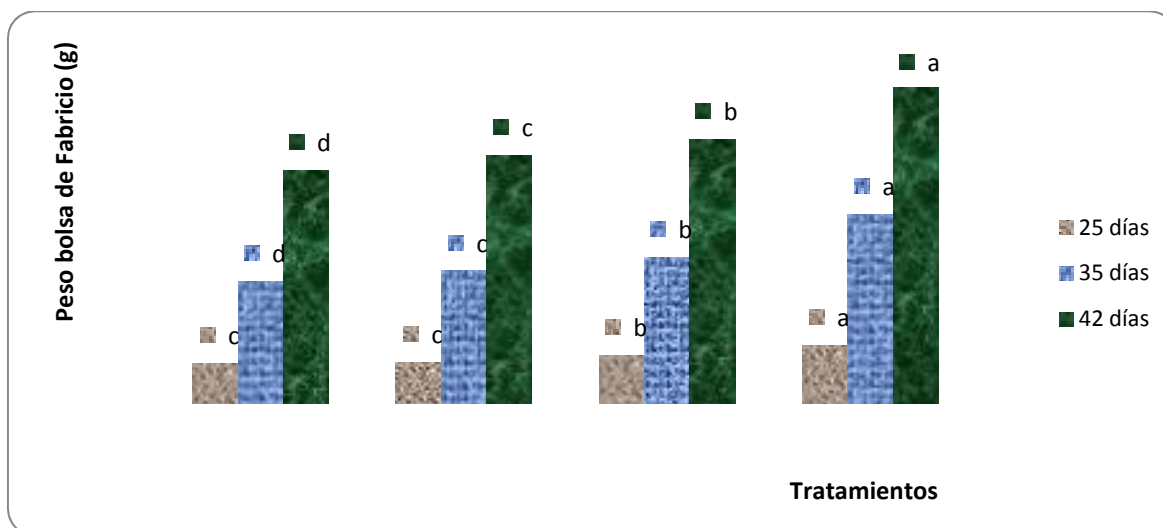
En la figura 1 se muestra la dinámica del peso del bazo ante la aplicación del biopreparado con *Bacillus subtilis* y sus endosporas en pollos de ceba. Se observa un incremento de peso ($P < 0,001$) en todos los animales tratados con el biopreparado y momentos de muestreo, con los mayores pesos en el tratamiento T4.



a,b,c,d Letras diferentes entre tratamientos en cada momento de muestreo difieren para $P < 0.05$ (Duncan, 1955). $P < 0,001$ EE \pm 0,14

Figura 1. Dinámica del peso del bazo ante la aplicación de un biopreparado con *Bacillus subtilis* y sus endosporas en pollos de ceba.

La figura 2 presenta la dinámica del peso de la bolsa de Fabricio ante la aplicación del en pollos de ceba. Existe un incremento de peso ($P<0,01$) en todos los animales tratados y momentos de muestreo, con los mayores peso en el tratamiento, también en T4.



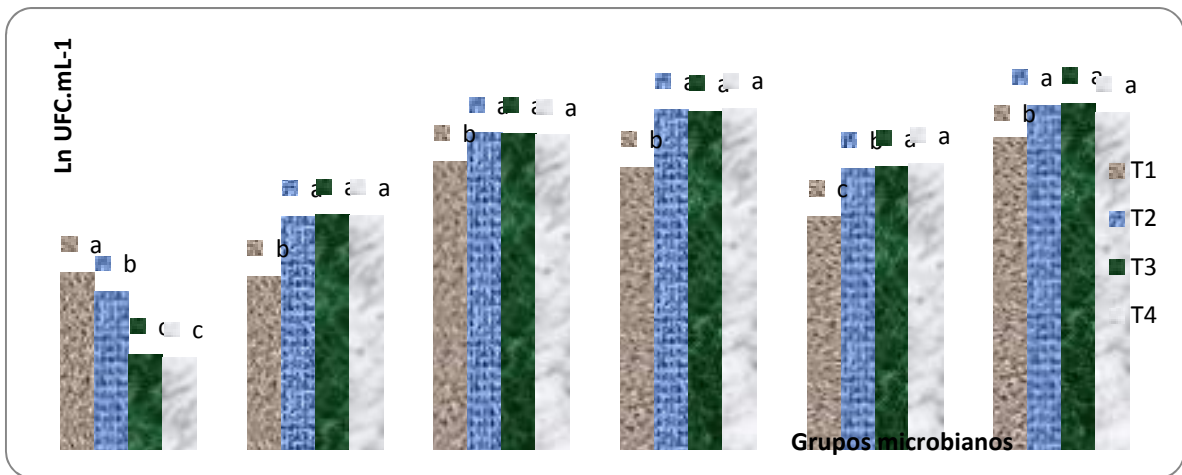
a,b,c,d Letras diferentes entre tratamientos en cada momento de muestreo difieren para $P<0.01$ (Duncan, 1955). $EE\pm 0,22$

Figura 2. Dinámica del peso de la bolsa de Fabricio ante la aplicación de un biopreparado con *Bacillus subtilis* y sus endosporas en pollos de ceba.

Tanto el bazo como la bolsa de Fabricio son órganos relacionados con la respuesta inmune en el ave (Milián *et al.* 2008). Los resultados obtenidos se relacionan con investigaciones llevadas a cabo por Milián (2009), quien obtuvo incrementos en el peso de estos órganos cuando empleó cultivos de *Bacillus* spp en pollos de ceba. Por otra parte Piad *et al.* (2006) alcanzaron mejoras en el peso de estos órganos, cuando aplicaron un biopreparado probiótico a base de levadura hidrolizada y un cultivo de *Bacillus licheniformes*, también en pollos de ceba.

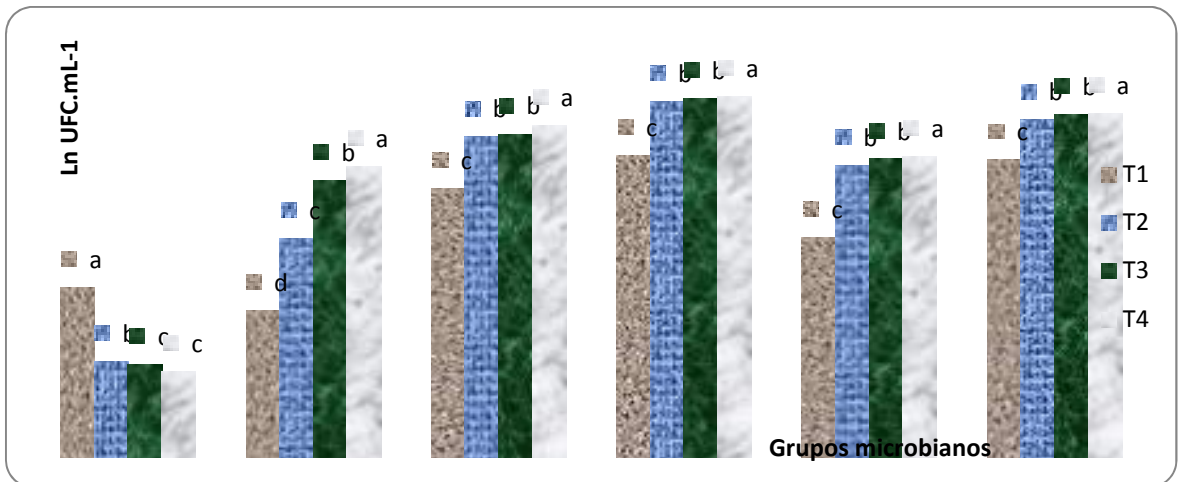
Los conteos microbianos a nivel de ciegos, con los diferentes tratamientos y momentos de muestreos, se muestra en las figuras 3, 4 y 5. Se observa una disminución en el conteo de coliformes totales ($P<0,01$) en los animales con *B. subtilis*, así como incrementos en el número de endosporas de *Bacillus* spp,

formas vegetativas de *Bacillus* ssp, totales aeróbicos, bacterias ácido lácticas y totales anaeróbicos.



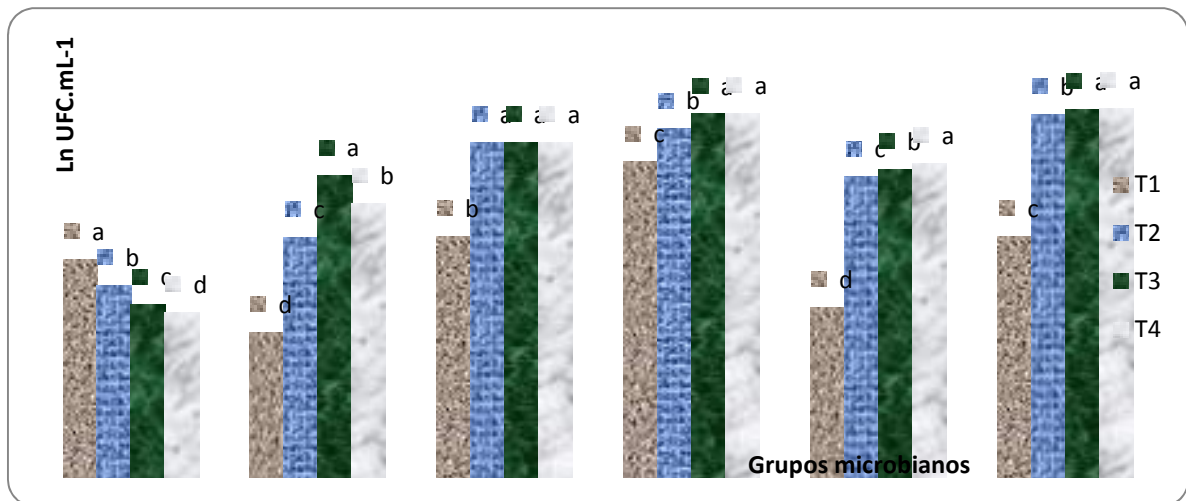
a,b,c Letras diferentes entre tratamientos en cada momento de muestreo difieren para $P < 0.05$ (Duncan, 1955). $P < 0,01$ $EE \pm 1,65$

Figura 3. Conteos microbianos ante la aplicación de un biopreparado con *Bacillus subtilis* y sus endosporas en pollos de ceba a los 25 días de edad..



a,b,c,d Letras diferentes entre tratamientos en cada momento de muestreo difieren para $P < 0.05$ (Duncan, 1955). $P < 0,01$ $ES \pm 1,76$

Figura 4. Conteos microbianos ante la aplicación de un biopreparado con *Bacillus subtilis* y sus endosporas en pollos de ceba a los 35 días de edad.

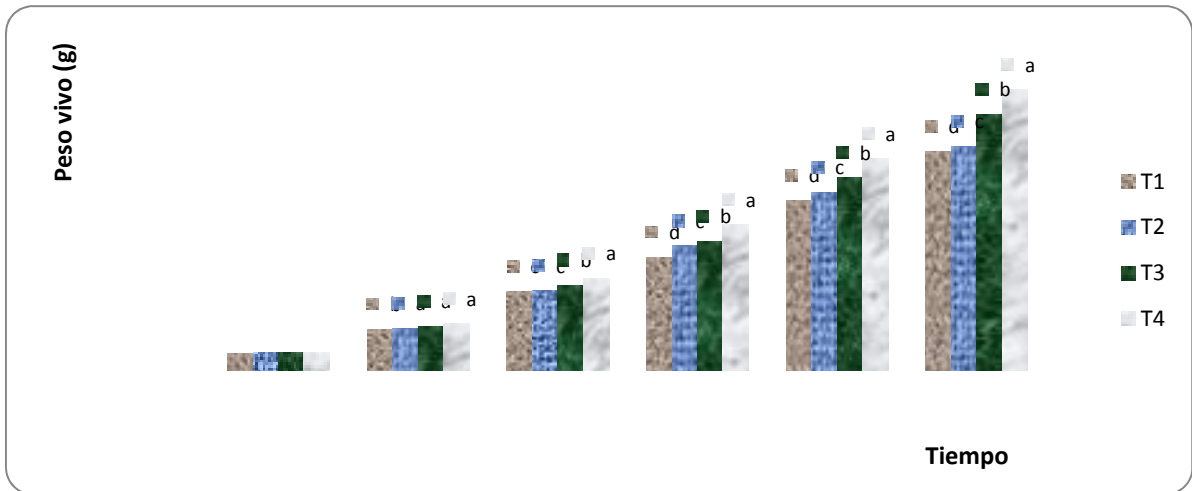


a,b,c,d Letras diferentes entre tratamientos en cada momento de muestreo difieren para $P < 0.05$ (Duncan, 1955). $P < 0,01$ $ES \pm 1,41$

Figura 5. Conteos microbianos ante la aplicación de un biopreparado con *Bacillus subtilis* y sus endosporas en pollos de ceba a los 42 días de edad.

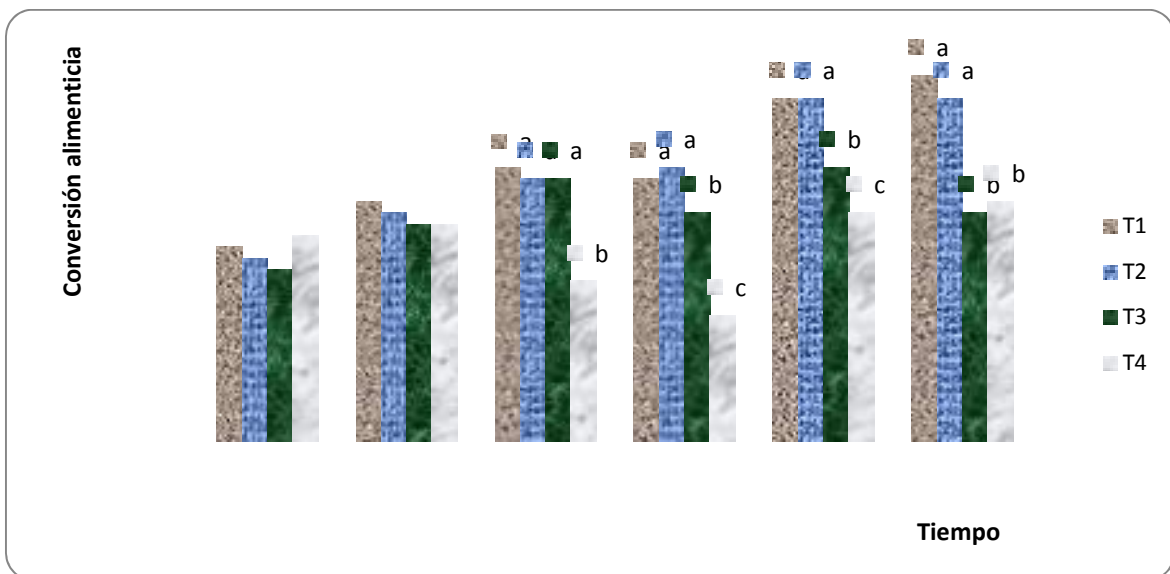
La disminución en el conteo de coliformes totales en los animales con *B. subtilis*, así como incrementos en el número de endosporas de *Bacillus* spp, formas vegetativas de *Bacillus* spp, totales aeróbicos, bacterias ácido lácticas y totales anaeróbicos son una evidencia científica de la acción del biopreparado probiótico empleado en la mejora del balance de la microflora intestinal en los animales. Resultados similares son informados por Casula. & Cutting, (2002), así como por Gil de los Santos *et al.* (2005).

Las figura 6 y 7 muestran la dinámica del peso del peso vivo y la conversión alimenticia ante la aplicación del biopreparado en pollos de ceba. Existe un incremento en el peso vivo ($P < 0,01$) en todos los animales tratados con los mayores peso en el tratamiento T4 a partir de los 21 días.



a,b,c,d Letras diferentes entre tratamientos en cada momento de muestreo difieren para $P < 0.01$ (Duncan, 1955). $EE \pm 13,61$

Figura 6. Dinámica del peso vivo ante la aplicación de un biopreparado con *Bacillus subtilis* y sus endosporas en pollos de ceba.



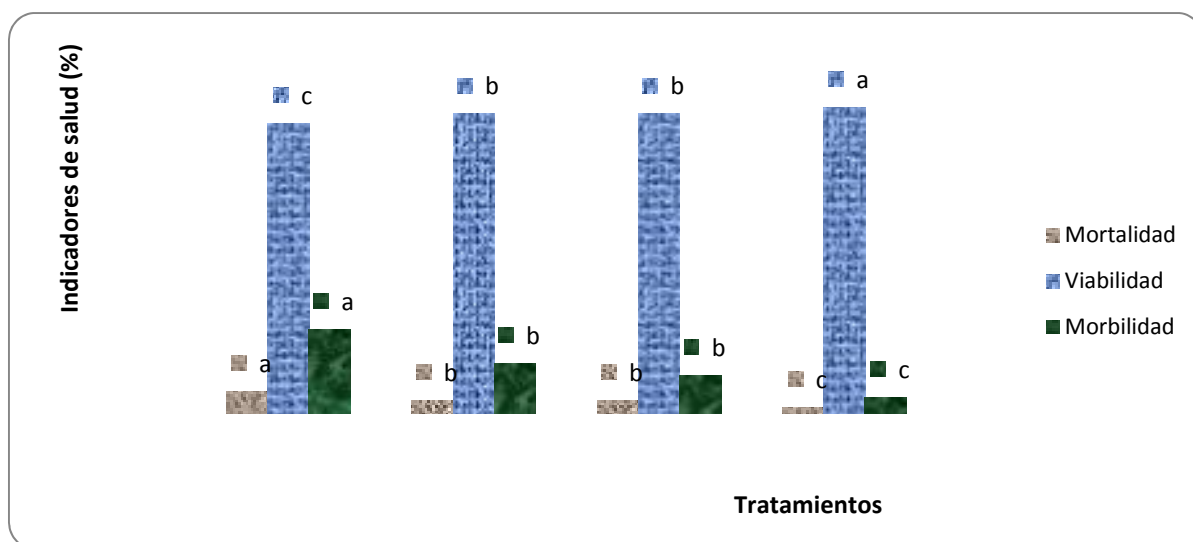
a,b,c Letras diferentes entre tratamientos en cada momento de muestreo difieren para $P < 0.05$ (Duncan, 1955). $EE \pm 0,40$

Figura 7. Dinámica de la conversión alimenticia ante la aplicación de un biopreparado con *Bacillus subtilis* y sus endosporas en pollos de ceba.

El mejor comportamiento en los indicadores productivos peso vivo y conversión alimenticia están relacionados con la mejora en los indicadores de respuesta inmune y de microbiología intestinal. En ese sentido Milián (2009) encontró una mejora en estos indicadores cuando empleó un cultivo de *Bacillus*

subtilis durante todo el ciclo de cría en pollos de ceba. Igual resultado fue obtenido por Opalinski *et al.* (2007) en pollos de ceba.

La dinámica de algunos indicadores de salud se indican en la figura 8. Existe una mejora en la mortalidad, viabilidad y morbilidad en todos los animales tratados.



a,b,c Letras diferentes entre tratamientos en cada momento de muestreo difieren para $P < 0.05$ (Duncan, 1955). $P < 0,001$ $ES \pm 1,35$

Figura 8. Dinámica de la conversión alimenticia ante la aplicación de un biopreparado con *Bacillus subtilis* y sus endosporas en pollos de ceba.

CONCLUSIONES

Con el empleo de un cultivo de *Bacillus subtilis* como probiótico en una dosis de 1,5 mL en el agua de bebida provocó en pollos de engorde mejoras en indicadores inmunológicos, microbiológicos, productivos y de salud.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apajalahti J., Kettunen A. y Gram H. 2004. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World Poult. Sci. J.* 60:223–232.
- Barbosa T., Claudia R. S., La Ragione R., Martí J. W., Adriano H. O. 2005. Screening for *Bacillus* Isolates in the Broilers Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (2): 968-978.
- Barbosa T., Claudia R. S., La Ragione R., Martí J. W., Adriano H. O. 2005. Screening for *Bacillus* Isolates in the Broilers 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 Environ. Microbiol* May 68(5): 2344-2350.
- Casula, G. & Cutting, S. M. 2002. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Applied Environ. Microbiol* May 68(5): 2344-2350.
- Conway P.L., Gorbach S.L. y Goldin B.R. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cell. *J. Dairy Sci.* 70:1-12.
- Ferreira A. J. P., Ferreira C. S. A., Knobl T., Moreno A. M., Bacarro M. R., Chen M., Robach M., y Mead G. C. 2003. Comparison of three commercial competitive-exclusion products for controlling *Salmonella* colonization of broilers in Brazil. *Journal of Food Protection*, 66, 490–492.
- Ferreira C.L.L.F. Teshima, E. 2000. Probióticos: Estrategia dietética para la mantenimiento de una microbiota colónica saludable. *Biotecnología Ciencia y Desarrollo*. Año III No.16: 22-25.
- Fuller R. 1977. The importance of *Lactobacilli* in maintaining normal microbial balance in the crop. *Br. Poult. Sci.* 18: 85-94.
- Garlich J. D. 1999. Microbiología del tracto intestinal aviar. Conferencia presentada en el XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura. Lima, Perú. Sep 24.
- Gil de los Santos, J. R., Storch, O. B. & Gil-Turnes, C. 2005. *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis* . *British Poultry Science*. 46.(4):494 – 497.
- Huang M. S. y Ronald E. 2000. Transient Growth Requirement in *Bacillus subtilis* following the cessation of exponential growth. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (3): 1220-1222.
- Jawets. 1996. Microbiología Médica. Editorial El Manual Moderno.15 .Edición:834-835.
- Khaksefidi A. y Ghoorchi T. 2006. Effect of Probiótica on Performance and Immunocompetence in Broiler Chicks. *Rev. Journal of Poultry Science*, 43: 296-300.