

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UNA MEZCLA PROBIÓTICA DE EXCLUSIÓN COMPETITIVA Y SU ESTABILIDAD EN EL TIEMPO

M. Pérez¹, Marta Laurencio¹, Ana J. Rondón¹, G. Milian¹, R. Bocourt², Fátima Arteaga³

¹Universidad de Matanzas «Camilo Cienfuegos» Vía Blanca a Varadero Km 3 ½. Matanzas. Correo electrónico: manuel.perez@umcc.cu; ²Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas. Mayabeque. La Habana; ³Escuela Superior Politécnica de Manabí. Ecuador

RESUMEN: Se determinó la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias potencialmente patógenas de una mezcla de exclusión competitiva (MEC) y se determinó la estabilidad de dicha mezcla en el tiempo. Para la obtención de la MEC se sacrificaron cinco pollos de ceba del híbrido H₂ adultos y saludables de 45 días de edad. Para determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* se emplearon diferentes cepas indicadoras y para evaluar la estabilidad durante el almacenaje se consideraron dos condiciones de temperaturas: ambiente (32 y 34 °C) y de refrigeración entre 4-8°C. Finalmente se realizó un análisis de la calidad microbiológica de la MEC. Se observó inhibición del crecimiento de todas las cepas indicadoras por la producción de ácido (variante 1), excepto para la cepa *Lactobacillus salivarius*. La MEC presentó una alta producción de ácido acético, propiónico y butírico. Se demostró una elevada capacidad de crecimiento y estabilidad durante el almacenaje por 30 días de la MEC en condiciones de refrigeración y ambientales, así como una buena calidad microbiológica.

(Palabras clave: mezcla de exclusión competitiva; probiótico; actividad antimicrobiana; calidad microbiológica)

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF A COMPETITIVE EXCLUSION PROBIÓTICO MIXTURE AND ITS STABILITY IN TIME

ABSTRACT: The *in vitro* antimicrobial activity against pathogenic potentially bacteria from a competitive exclusion mixture (CEM) and its stability in time were determined. To obtain CEM, five adult and healthy broilers from H₂ hybrid of 45 days of age, were sacrificed. The *in vitro* antimicrobial activity of CEM against indicator strains and its stability during storage at different temperatures were determined. Finally, a microbial quality analysis of CEM was carried out. Growth inhibition of all indicator strains was observed by acid production (variant 1), except from *Lactobacillus salivarius*. CEM showed a high level of acetic, propionic and butyric acids. A high grow capacity and satiability was demonstrated during 30 days of CEM storage under refrigeration and environmental conditions, as well as a good microbial quality.

(Key words: competitive exclusion mixture; probiótico; antimicrobial activity; microbial quality).

INTRODUCCION

La producción avícola intensiva implica la no presencia de la madre junto al pollito en el momento de la eclosión, ni en su futuro desarrollo. Esta situación trae consigo el establecimiento tardío de la microbiota protectora del tracto digestivo de estos animales con la

consecuente aparición de enfermedades entéricas, producto de la rápida colonización por microorganismos patógenos. En la actualidad, numerosos países utilizan en la avicultura las mezclas de exclusión competitiva (MEC); sin embargo, en Cuba, no se emplean estos productos, pero existe la experiencia biotecnológica necesaria para desarrollarlos con tec-

nologías económicamente viables y que a su vez, mejoren el rendimiento productivo y la salud de los animales (1, 2, 3).

Las mezclas de exclusión competitiva están constituidas por microorganismos autóctonos digestivos aislados del tracto digestivo de aves adultas saludables. Estos biopreparados ejercen su efecto probiótico, principalmente por la exclusión de microorganismos patógenos, por su efecto antimicrobiano y la producción de ácido láctico, creando un ambiente favorable para la respuesta inmunológica y la prevención de enfermedades infecciosas en animales y el hombre (4, 5, 6, 7, 8).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad antimicrobiana de una mezcla probiótica de exclusión competitiva, evaluar su estabilidad en el tiempo y su calidad microbiológica en frío y a temperatura ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Para la obtención de los cultivos microbianos se sacrificaron cinco pollos de ceba del híbrido H₂ adultos y saludables de 45 días de edad, por el método de dislocación cervical (9). Una vez que se pesaron 10 g de raspado de la mucosa en condiciones de esterilidad, se añadieron en 90 mL de caldo de Mann Rogosa Sharper (MRS) para el aislamiento de las bacterias ácido lácticas (BAL) y el cultivo se incubó en condiciones estáticas a 37°C por 12 h. El aislamiento de las endosporas de *Bacillus* spp. se desarrolló a partir de la dilución de 10 g de contenido cecal en 90 mL de suero salino estéril (SSE). Esta dilución se sometió a un tratamiento térmico a 71°C por 10 minutos para eliminar las formas vegetativas. Posteriormente se inocularon 10 mL de la suspensión de endosporas en 90 mL de caldo nutriente y se incubó durante 12 h a 37°C en condiciones de zaranda a 150 rpm. Posteriormente estos caldos sirvieron de inóculos para la MEC elaborada con materias primas nacionales e incubadas por 24 h a 37°C en condiciones estáticas.

Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de la MEC frente a cepas indicadoras.

Se empleó la técnica de difusión en agar propuesta por Chaveerach *et al.* (10). Se tomaron 10 mL de la mezcla y se centrifugaron a 15 000 rpm a 5°C por 10 min en centrífuga refrigerada (P-selecta-Mixtasel). Seguidamente, se esterilizó el sobrenadante a través de filtros de acetato de celulosa con poros de 0,22 µm (Minisart, satorius 600 kPa max).

El sobrenadante se utilizó en tres variantes:

V₁ - Sobrenadante.

V₂ - Sobrenadante tratado con la adición de NaOH 0,5 N (hasta pH 7) y pronasa E (Merck) al 1 % para eliminar la acción de ácidos y de bacteriocinas, respectivamente.

V₃ - Sobrenadante tratado con la adición de NaOH 0,5N (hasta pH 7) y catalasa (Merck) al 0,1 % para eliminar la acción de ácidos y el peróxido de hidrógeno, respectivamente.

Cepas indicadoras utilizadas.

Las cepas indicadoras que se utilizaron se describen a continuación:

Cepas salvajes de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. y *Klebsiella* spp., aisladas del hígado de pollos enfermos e identificadas en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Aviar (LIDA) de Matanzas. Una cepa de *Bacillus subtilis* y otra de *Lactobacillus salivarius*, ambas pertenecientes a la colección de cultivos del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas y del Laboratorio de Producción de Alimentos del Instituto de Ciencia Animal.

Todas las cepas indicadoras se inocularon en caldo nutriente enriquecido y se incubaron en zaranda termostataada (MAXQ-600) durante 18 h a 37°C, a excepción de la cepa de *Lactobacillus salivarius* que se cultivó en caldo MRS por 18 horas a 37°C, en condiciones estáticas.

Desarrollo de la técnica de difusión en Agar

De los cultivos de las cepas indicadoras se tomaron 200 µL, se inocularon en tubos con 20 mL de agar nutriente enriquecido (con 1 % de Ión-Agar, OXOID) a 45°C, los que fueron vertidos en placas para su solidificación. En cada placa que contenía las cepas indicadoras se abrieron pocillos de 7 mm de diámetro, en los que se depositaron 20 µL de las variantes 1, 2 y 3 de la mezcla productora. Se realizaron además controles positivos con la mezcla M2 más ácido láctico 1N hasta alcanzar pH 3 y controles negativos con M2 a pH 7. Las placas se mantuvieron a 5°C por un tiempo de 4 h para una mejor difusión de las sustancias en el agar. Luego se incubaron por 24 horas 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.

Estabilidad de la MEC-M2 durante el almacenaje en dos condiciones de temperatura

Para caracterizar la estabilidad del biopreparado se utilizó la metodología que empleó Brizuela (11), quien evaluó indicadores de estabilidad de un biopreparado con fines probióticos.

Con este propósito, se desarrolló un ensayo por 28 días, con 10 momentos de muestreos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21 y 28 días). Para ello, se preparó la MEC, la cual se distribuyó en 120 frascos de cristal los cuales se sometieron a dos condiciones de temperatura: refrigeración, 4-8°C y temperatura ambiente, 32± 2°C, con tres repeticiones. Se determinó la viabilidad de las BAL y *Bacillus* sp. y el comportamiento del pH.

Análisis de la calidad microbiológica de la MEC-M2

Se determinó en el Laboratorio de Microbiología de la Planta Libertad de Colón, Matanzas, perteneciente a la Empresa Provincial de Alimentos. Este estudio se realizó diariamente durante la primera semana y después una vez por semana, hasta concluir a los 30 días. Todos los datos presentados son valores medios de dos determinaciones y tres réplicas por tratamiento. En cada uno de los muestreos se desarrolló el conteo de las BAL y *Bacillus* spp. por el método de las diluciones seriadas (12).

El conteo de microorganismos contaminantes se desarrolló a partir de las normas de Microbiología de los Alimentos para consumo humano y animal (13). Se realizaron diluciones seriadas de las muestras según NC-ISO. Se realizaron diferentes técnicas para determinar los microorganismos contaminantes las cuales se relacionan en la Tabla 1.

TABLA 1. Determinación de microorganismos contaminantes./ *Determination of contaminant microorganisms*

Microorganismos	Referencia NC-ISO
Coliformes totales y fecales	4832: 2002
Hongos y levaduras	7954: 2002
<i>Salmonella</i> spp.	6579: 2004
<i>Staphylococcus aureus</i>	6888: 2002
<i>Bacillus cereus</i>	7932: 1993
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	4833: 2002

Determinación de ácidos grasos de cadena corta, totales y fraccionados

Para su determinación se centrifugaron 5 mL muestras a 10 000 g por 10 min. Se determinaron los contenidos de ácidos grasos de cadena corta, totales y frac-

cionados (acético, propiónico, butírico, valérico, isovalérico e isobutírico) por cromatografía gaseosa en cromatógrafo Perkin-Elmer Autosystem XL (EE.UU.) equipado con inyector automático, detector de ionización de llama (FID) y columna capilar TR-FFAP, de 30 m x 0,53 mm x 1 µm (Supelco, EEUU). Las condiciones de análisis fueron: temperaturas de 140, 200 y 250°C en columna, inyector y detector respectivamente y flujo de Helio He (gas portador) de 13 mL.min⁻¹. Se inyectó 1 µL de cada muestra y se empleó una relación de *split* de 1/3. Como estándar interno se utilizó el ácido crotonico (14).

Procesamiento estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el sistema INFOSTAT Versión 1 (12). Los análisis de varianza se realizaron para verificar diferencias entre medias, con un nivel de significación de P< 0,05. La prueba de Duncan (14) se utilizó 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.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la actividad antimicrobiana frente a cepas indicadoras

En la Tabla 2 aparece la acción antimicrobiana de las MEC frente a diferentes cepas indicadoras.

Se observa inhibición del crecimiento de todas las cepas indicadoras por la producción de ácido (variante 1), excepto para la cepa *Lactobacillus salivarius*, que no fue inhibida. Según estos resultados, se aprecian diferencias (P<0,001) en el diámetro de inhibición que produce la MEC frente a las diferentes cepas indicadoras. En este sentido se observaron halos de inhibición de mayor diámetro cuando la MEC se enfrentó a la cepa de *E. coli* a las 12, 18 y 24 h. Se conoce que durante las primeras semanas de vida de las aves de granja en Cuba, el principal agente causal de las enfermedades diarreicas es *Escherichia coli* y aproximadamente el 70 % de las micosis respiratorias en pollitos se acompaña de infecciones por enterobacterias, destacándose la presencia de esta bacteria, como el microorganismo más comúnmente aislado (9,15).

En las variantes 2 y 3, (datos no mostrados) no se observaron halos de inhibición en los pocillos, lo cual demuestra que no se produjo la inhibición por bacteriocinas o peróxido de hidrógeno.

A medida que aumentó la fermentación de los carbohidratos del medio, el pH disminuyó y el halo de

TABLA 2. Actividad antimicrobiana de la MEC M2 frente a diferentes cepas indicadoras (variante 1)./ *Antimicrobial activity of CEM M2 against different indicator strains (variant 1)*

Cepas indicadoras	MEC productora (halo de inhibición, mm)		
	Hora 12	Hora 18	Hora 24
<i>E. coli</i>	14,00 ^e	13,90 ^d	14,10 ^e
<i>Salmonella</i> spp.	13,30 ^d	13,20 ^d	13,00 ^d
<i>Staphylococcus</i> spp.	9,50 ^b	9,00 ^b	9,50 ^b
<i>Klebsiella</i> spp.	8,00 ^a	8,00 ^a	8,40 ^a
<i>Bacillus subtilis</i>	12,50 ^c	12,30 ^c	12,40 ^c
<i>L. salivarius</i>	NI	NI	NI
± EE Sig	0,06***	0,05***	0,06***

NI. No inhibición Los resultados son el promedio de tres determinaciones.

a,b,c,d,e. Medias con letras diferentes dentro de cada columna difieren para $P < 0,05$ (14). *** $P < 0,001$

inhibición fue mayor. Un incremento del diámetro de los halos se produjo cuando el pH del sobrenadante estaba en 4, lo cual coincide con la hora 24. Resultados similares obtuvieron Reque *et al.* (16) cuando utilizaron una cepa de *Lactobacillus fermentum* LPB aislada del contenido intestinal de pollos, la que inhibió *in vitro* a *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, por la disminución del pH del medio.

La cepa indicadora *Lactobacillus salivarius* no mostró inhibición en ninguna de las variantes. Estos resultados indican que la disminución del pH hasta 4 no causó ningún efecto en los lactobacilos, lo cual confirma que esta bacteria tiene la capacidad de crecer a pH bajo y en presencia de altas concentraciones de ácidos (17). En el caso de *Bacillus subtilis* se observó inhibición del crecimiento a medida que disminuyó el pH, resultados que coinciden con lo expresado por Milián (18), quien refiere que las cepas de *Bacillus subtilis* en estado vegetativo son sensibles a la disminución del pH, efecto que provoca el cese del crecimiento y la formación de la endospora.

Según Van der Wielen *et al.* (19), Forestier *et al.* (20) y Nazef *et al.* (21) las BAL homo y heterofermentativas producen ácidos orgánicos tales como láctico, acético, butírico y propiónico, los cuales disminuyen el pH del intestino y previenen la colonización por bacterias indeseables que no proliferan ante tal efecto. Los ácidos orgánicos que producen las BAL actúan sobre las bacterias sensibles al penetrar sus paredes, con la condición de que la molécula de ácido este en forma no disociada. Una vez que estos ácidos traspasan esta barrera se disocian en sus dos componentes, el anión, que modifica el material genético de la célula y el catión, que acidifica el citoplasma, lo que somete a la célula a un alto desgaste energético para neutralizarlo (22).

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la producción de ácidos grasos de cadena corta, totales y fraccionados, a las 24 horas de incubación. Los valores muestran que la MEC-M2 produce suficientes niveles de estos componentes antimicrobianos para ejercer su efecto sobre los enteropatógenos intestinales y favorecen un adecuado balance de la microbiota intestinal. Esta característica incide en la reducción del pH intestinal, lo cual se considera el principal factor en la inhibición del desarrollo de enteropatógenos como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y *Campylobacter* spp. (23,24). Además, la acidificación del lumen intestinal acelera las reacciones bioquímicas de la digestión (7, 8).

Se conoce que los AGCC (principalmente el ácido propiónico) pueden inhibir la síntesis de colesterol en el hígado (25). El uso continuo de probióticos favorece la producción de niveles apreciables de estos ácidos; esta pudiera ser una de las causas por las que su empleo reduce la producción de esta sustancia (26).

Estabilidad de la MEC durante el almacenamiento en dos sistemas de temperatura

En la Figura 1 aparecen los resultados del conteo de BAL y *Bacillus* spp. y la determinación del pH durante la primera semana y a los 14, 21 y 28 días. Se observa, que al cuarto día, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración, la viabilidad de las BAL comienza a disminuir paulatinamente hasta el séptimo día y posteriormente se mantiene estable hasta los 28 días. En cambio, para *Bacillus* los valores se mantienen constantes. En condiciones de refrigeración el conteo de viables de BAL manifestó mejor estabilidad hasta las 72 h, mientras que a temperatura ambiente se produce una disminución paulatina de este grupo microbiano. Este resultado pudiera estar dado porque las BAL producen ácido láctico y AGCC (27, 17), lo cual provoca que disminuya el pH a niveles muy

TABLA 3. Producción de ácidos grasos de cadena corta totales y fraccionados (mmol/L) a las 24 h de incubación de la MEC. Production of total and fractionated fatty acids of short chain (mmol/L) at 24 h of CEM incubation

	Acético	Propiónico	Butírico	Valérico	Isovalérico	Isobutírico	AGCC totales
MEC	120,96	7,70	5,50	1,76	0,86	0,66	136,60
DE	3,45	1,23	0,06	0,20	0,06	0,09	4,45
CV	3,66	1,64	1,04	0,34	0,06	0,02	4,69

DE- Desviación Estándar, CV- Coeficiente de Variación (%).

Los resultados son el promedio de tres determinaciones.

bajos y algunas células no resistan estas condiciones. De igual manera en el caso de las células de *Bacillus* se detiene el crecimiento y comienza la formación de las endosporas en esta etapa. Estas estructuras de resistencia permiten la viabilidad por largos períodos de tiempo (28).

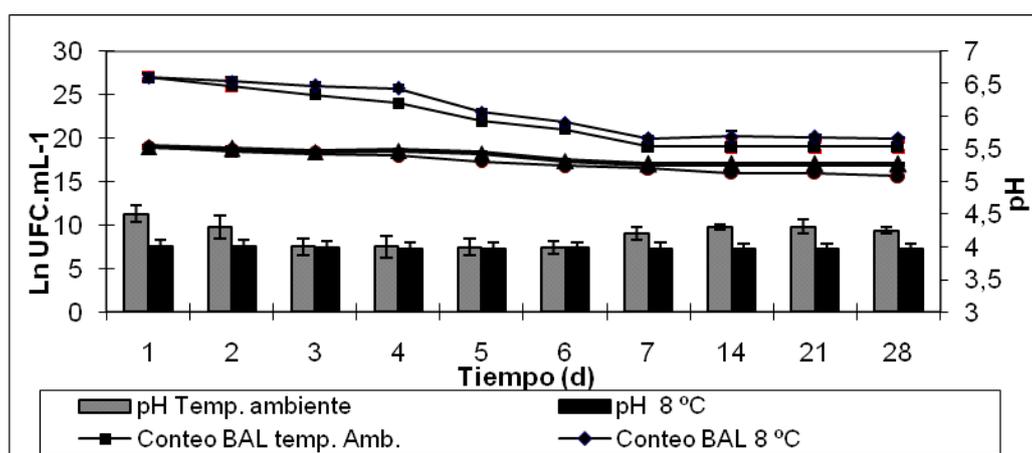
El pH de la mezcla se mantuvo sin variaciones en condiciones de refrigeración hasta los 28 días. Sin embargo, a temperatura ambiente, a las 72 h se observa una disminución de estos valores, manteniéndose estable hasta los seis días. A partir de los siete días hasta los 14 se presenta un incremento, manteniéndose estable hasta el final.

Algunos autores consideran como aceptable que los cultivos con actividad probiótica presenten una concentración celular en el orden de 9 Log UFC. mL⁻¹ (29). Los resultados que se muestran en el presente trabajo pueden considerarse estables hasta los 30 días para ambas temperaturas, ya que se obtienen conteos superiores a las dosis establecidas para emplearse como mezclas de exclusión competitiva. Brizuela (11),

Rondón (17) y Milián (18), obtuvieron resultados similares en productos probióticos cuando evaluaron la estabilidad de BAL y *Bacillus*.

En relación al comportamiento del pH, en ambas mezclas hay un mejor comportamiento de estabilidad en condiciones de refrigeración. A temperatura ambiente, probablemente estos cambios se producen debido a las reacciones metabólicas que desarrollan los lactobacilos en la degradación de aminoácidos procedentes del medio o de la lisis de células muertas. Estos procesos ocurren cuando se agotan los carbohidratos del medio y las células utilizan a los aminoácidos como fuentes de carbono en el metabolismo celular. En estas reacciones, los grupos amino de los aminoácidos son removidos y el amoníaco puede aparecer como producto secundario, con lo cual el pH del medio tiende a aumentar.

Investigaciones futuras deberán dirigirse a evaluar otros métodos de conservación, como el secado, para mantener la viabilidad en el tiempo con mejor estabilidad.



Líneas de barras representan DE.

FIGURA 1. Dinámica de la viabilidad de las BAL y *Bacillus* spp. y comportamiento del pH de la MEC durante su almacenamiento en dos condiciones de temperatura. / *BAL and Bacillus* spp. viability dynamics and pH behavior of CEM during its storage under two temperature conditions.

TABLA 4. Caracterización de la calidad microbiológica de la MEC a los 30 días de almacenaje/ *CEM microbiological quality characterization at 30 days of storage*

Índices analizados	Condiciones ambientales (25 ± 3 °C)	Condiciones de refrigeración (8°C)
<i>Lactobacillus</i>	9 Log UFC.mL ⁻¹	10 Log UFC.mL ⁻¹
<i>Bacillus</i> spp.	8 Log UFC.mL ⁻¹	9 Log UFC.mL ⁻¹
Coliformes totales (UFC/mL)	negativo	negativo
Coliformes fecales (UFC/mL)	negativo	negativo
<i>Salmonella</i> spp. (en 25 mL)	negativo	negativo
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (NMP/100 mL)	Menor de 2,2	Menor de 2,2
<i>Bacillus cereus</i> (UFC/mL)	Menor de 10	Menor de 10
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL)	negativo	negativo
Conteo de levaduras viables por mL	< 10 UFC.mL ⁻¹	< 10 UFC.mL ⁻¹
Conteo de mohos viables	< 10 UFC.mL ⁻¹	< 10 UFC.mL ⁻¹

Calidad microbiológica de la MEC a los 30 días

La observación al microscopio, a partir de la tinción de Gram, mostró que existen abundantes formas bacilares y estructuras esporuladas. En la Tabla 4 se observan los resultados de la caracterización microbiológica de la mezcla durante el almacenaje.

Se puede apreciar que la mezcla presenta niveles altos de lactobacilos y bacilos sin presencia de contaminantes. Las condiciones de asepsia a nivel de laboratorio y la acidez característica del cultivo, favoreció la no proliferación de agentes microbianos extraños durante todo el período de almacenaje. A los 30 días, presentó buena calidad sanitaria, ya que es un biopreparado libre de contaminantes. Resultados similares obtuvieron Rondón (17) y Milián (18) al evaluar biopreparados probióticos para uso avícola.

CONCLUSIONES

Se demostró que la mezcla de exclusión competitiva manifestó actividad probiótica *in vitro*, debido a su acción antimicrobiana frente a microorganismos potencialmente patógenos como *E. coli* y *Salmonella*.

Se confirmó que la MEC-M2 obtenida presentó estabilidad en la viabilidad microbiana hasta los 30 días, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el financiamiento del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de Cuba y la Escuela Superior Politécnica «Manuel Félix López» en Ecuador, además contó con el apoyo metodológico del Dr. Carlos Martín Medina de la Universidad de Matanzas «Camilo Cienfuegos» de Cuba.

REFERENCIAS

1. Nurmi E, Rantala M. New aspect of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature*. 1973; 41: 210-211.
2. 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*. 2005; 5(1):48-53.
3. Samaniego L, Laurencio M, Pérez M, Milián G, Rondón AJ. Actividad probiótica de una mezcla de exclusión competitiva sobre indicadores productivos en pollos de ceba. *Cienc Tecnol Aliment*. 2007; 5 (5): 360-367.
4. Rodríguez A, Nardo R, Bambirra E, Vieira E, Nicoli J. Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. *J Appl Bacteriol*. 1996;81: 251-256.
5. AOAC. Official method of analysis of A.O.C 10th Edic. Assoc. of official Agricultural Chemists. Washington DC.1995.
6. Bocourt R, Savón L, Díaz J. Efecto de la actividad probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* en indicadores fisiológicos, productivos y de salud de cerdos jóvenes. XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Palacio de las Convenciones. Ciudad de la Habana, Cuba. 2002 ;135.
7. Pascual MH, Badiola M, Monfor JI, Garriga M. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. *Appl Environm Microbiol*. 1999; 65:4981-4986.

8. Pérez M, Laurencio M, Piad R, Milián G, Rondón AJ, Amigo S et al. Evaluación de la actividad probiótica de un producto de exclusión competitiva sobre indicadores microbiológicos en el ciego de pollos de ceiba. *Rev Cubana Ciencia Avícola*. 2002; 26: 29-35.
9. Sánchez A. Enfermedades de las aves. Eds. ENPES. La Habana. 1997; 441p.
10. Chaveerach P, Keuzenkamp DA, Urlings HA, Lipman I, Van Knapen F. In vitro study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni* / *coli* populations in mixtures of water and feed. *Poult Sci*. 2002;81:621-628
11. Brizuela MA. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. Tesis Dr. Ciencias Veterinaria. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba 2003.
12. Belzarini MG, Casonoves F, Di Rienzo JA, Gonzales LA, Robledo CW. INFOSAT, versión 1 Córdoba Argentina DC 1995.
13. Bennett RW, Lancette GA. Food and Drug Administration (FDA) Bacteriological Analytical Manual. 2007. Disponible en <http://www.fda.gov/oc/spanish/> fecha de acceso Mayo 2007.
14. Duncan B. Multiple ranges and multiple F. test. *Biometrics*. 1995; (11):1.
15. García Y, López A, Bocourt R. Probióticos: Una alternativa para mejorar el comportamiento animal. *Rev. Cubana Cienc. Agríc*. 2005; 39:129-140
16. Reque E, Pandey A, Franco SG, Soccol CR. Isolation, identification and fisiological study of *Lactobacillus fermentum* LPB for use as probiotic in chickens. *Brazilian J Microbiol*. 2003;31:303-307.
17. Rondón AJ. Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación integral de las respuestas de tipo probióticas provocadas en estos animales. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal, Cuba. 2009.
18. Milian G. 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. Instituto de Ciencia Animal, Cuba. 2009.
19. Van der Wielen PW, Biesterveld S, Notermans S, Hofstra H, Urlings BA, Van Kapen F. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Appl Environm Microbiol*. 2000;(66):2536-2540.
20. Forestier C, Champs CD, Vatoux C, Joly B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res Microbiol*. 2001;152:167-173.
21. Nazef L, Belguesmia Y, Tani A, Prévost H, Drider D. Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: evidence on anti-Campylobacter and anti-Listeria activities. *Poult Sci*. 2008; 87:329-334.
22. Segura A, De Bloss M. La alternativa a los promotores del crecimiento. III Congreso Nacional de Avicultura. Memorias. Centro de Convenciones Plaza América. Varadero. Cuba. 2000;37-44
23. Adams C. Asistencia con resistencia. Avicultura y ácidos en la dieta. *Rev. Alimentos Balanceados para Animales*. 2000; 14-16.
24. Chaveerach P, Keuzenkamp DA, Urlings HA, Lipman I, Van Knapen F. In vitro study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni* / *coli* populations in mixtures of water and feed. *Poult. Sci*. 2002; 81:621-628.
25. López R. Biosíntesis del β (1,3)-glucano. *J Biochem*. 1997;20:212-219.
26. Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Grönlund MM, Isolauri E, Salminen SJ Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *Intern Dairy J*. 1999; (9):623-630.
27. Corrier DE, Hinton A, Ziprin RL, Deloach JR. Effect of dietary lactose on *Salmonella* colonization of market-age broiler chickens. *Avian Dis*. 1990;(34):668-676.
28. González F, González-Martínez BE. Criterios de Calidad de los Microorganismos Probióticos y evidencias sobre efectos Hipocolesterolémicos. *RESPYN*. 2006; 7:78-85.
29. Gilliland SE, Walker DK. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J Dairy Sci*. 1990; 73:905-911.

(Recibido 8-4-2011; Aceptado 20-10-2011)