

## Methodology for the isolation, identification and selection of *Bacillus* spp. strains for the preparation of animal additives

### Metodología para el aislamiento, identificación y selección de cepas de *Bacillus* spp. para la elaboración de aditivos zootécnicos

Grethel Milián Florido<sup>1</sup>, Ana J. Rondón<sup>1</sup>, M. Pérez<sup>2</sup>, Fátima Arteaga<sup>3</sup>, R. Bocourt<sup>4</sup>, Yadileiny Portilla<sup>5</sup>, Marlen Rodríguez<sup>1</sup>, Y. Pérez<sup>1</sup>, A. Beruvides<sup>1</sup> and M. Laurencio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Matanzas. Autopista Varadero km 3 ½, Matanzas, Cuba.

<sup>2</sup>Universidad Estatal Amazónica. km. 2 ½. Vía a Tena (Paso Lateral), Puyo, Pastaza. Departamento de Ciencias de la Tierra. Ecuador.

<sup>3</sup>Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí. Ecuador. 10 de Agosto #82 y Granda Centeno

<sup>4</sup>Instituto de Ciencia Animal. Apartado Postal 24. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>5</sup>Universidad Autónoma de Madrid. Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049. Madrid, España  
Email: grethel.milian@umcc.cu

A methodology for the isolation, identification and selection of *Bacillus* spp. strains is established for probiotic purposes for their use in livestock interest. The strains were isolated from different ecosystems (bovine feces, caecum bird, decayed tomato juice and soil with slaughterhouse blood). The experiment was developed in three stages. The first one was related to the isolation, preselection and identification of the strains and conservation; the second with the evaluation of the growth capacity in a new culture medium, formulated from some national components (final molasses, *Saccharomyces cerevisiae* yeast cream hydrolyzate, calcium chloride and bacteriological peptone); the third stage included the integral evaluation of the effect of animal additives on probiotic response indicators in birds. With the proposed methodology, 100 strains were isolated, 48 of them with characteristics of the *Bacillus* spp. genus. The three strains were characterized (C-31, C-34 and E-44) that had the best characteristics as candidates for probiotics, capable of manifesting high growth capacity ( $P < 0.001$ ) in the new culture medium. The production cost of them was 2.34 Cuban pesos and 0.54 / L USD. These three animal additives showed their effect on chickens, when improving the probiotic response in the microbiological, immunological, fermentative, hematological and productive indicators in these animals. From the obtained results, it can be assured that the methodological proposal to isolate, identify and select *Bacillus* spp. strains can be applied in Cuba to improve the productive response in livestock interest.

Key words: *methodology, probiotics, bacilli*

The World Organization for Animal Health (OIE 2014) is working to introduce new products and technologies in animal production systems for the obtaining of healthy food, allowing high production with adequate economic sustainability and with biological guarantee to protect animals and humans. Among these products are the animal additives with probiotic effect, which represent a potentially significant and safe therapeutic advance (Pérez *et al.* 2015, 2016).

Taking into account the importance of animal additives with probiotic effect in our days, due to the increasing elimination of the use of antibiotics as growth promoters (AGP) in animal production (Furtula

Se establece una metodología para el aislamiento, identificación y selección de cepas de *Bacillus* spp. con fines probióticos para su uso en animales de interés zootécnico. Las cepas se aislaron de diferentes ecosistemas (heces de bovino, ciego de aves, jugo de tomate alterado y suelo con sangre de matadero). El experimento se desarrolló en tres etapas. La primera estuvo relacionada con el aislamiento, preselección e identificación de las cepas y conservación; la segunda con la evaluación de la capacidad de crecimiento en un medio de cultivo nuevo, formulado a partir de algunos componentes nacionales (miel final, hidrolizado de crema de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cloruro de calcio y peptona bacteriológica); la tercera etapa comprendió la evaluación integral del efecto de los aditivos zootécnicos en los indicadores de respuesta probiótica en aves. Con la metodología propuesta se aislaron 100 cepas, 48 de ellas con las características del género *Bacillus* spp. Se caracterizaron las tres cepas (C-31, C-34 y E-44) que tenían las mejores características como candidatas a probióticas, capaces de manifestar alta capacidad de crecimiento ( $P < 0.001$ ) en el nuevo medio de cultivo. El costo de producción de las mismas fue de 2.34 MN y 0.54/L USD. Estos tres aditivos zootécnicos mostraron su efecto en pollos, al mejorar la respuesta de tipo probiótica en los indicadores microbiológicos, inmunológicos, fermentativos, hematológicos y productivos en estos animales. A partir de los resultados obtenidos, se puede asegurar que la propuesta metodológica para aislar, identificar y seleccionar cepas de *Bacillus* spp. puede aplicarse en Cuba para mejorar las respuesta productiva en animales de interés zootécnico.

Palabras claves: *metodología, probióticos, bacilos*

La Organización Internacional de Epizootias (OIE 2014) trabaja por introducir en los sistemas de producción animal nuevos productos y tecnologías para la obtención de alimentos sanos, que permitan altas producciones con adecuada sostenibilidad económica y con garantía biológica para proteger a los animales y al hombre. Entre estos productos se encuentran los aditivos zootécnicos con efecto probiótico, que representan un avance terapéutico potencialmente significativo y seguro (Pérez *et al.* 2015, 2016).

Teniendo en cuenta la importancia de los aditivos zootécnicos con efecto probiótico en nuestros días, debido a la creciente eliminación del uso de los

*et al.* 2013, Torres *et al.* and Pérez *et al.* 2015), FAO and WHO (2002) defined a group of requirements and a methodology to follow to obtain strains of microorganisms that were recognized as safe GRAS and that could be used in the probiotics preparation.

The establishment of these criteria for the selection of strains for probiotic purposes is considered a priority due to the rapid incorporation of these products into the market. Most of the strains that are used for the elaboration of animal additives belong to the genus *Lacto Bacillus spp.*, *Bifidobacterium*, the yeasts, mainly those of the genus *Saccharomyces* and *Bacillus spp.* in a spore form (García and Carcassés 2012 and Milián *et al.* 2014). This conception is given by the probiotic effect that provides in the intestinal microbiota balance, the activation of the immune system, the improvement of the digestive physiology and, therefore, in the productive yields (Ayala *et al.* 2014, Milián *et al.* 2014 and Rodríguez 2015).

Researchers conducted by Milián *et al.* (2014) showed the ability of different probiotic products, obtained from autochthonous strains of *Bacillus subtilis*, to act in the replacement processes and cellular, metabolic and microbial maintenance, in the gastrointestinal tract, mainly at the level of the caecum.

It is known the existence of the commercialization of products made from strains of *B. licheniformis*, *B. subtilis* and their endospores (BioPlus 2B®, Biostart®, Toyocerin®, Licalife®, Biosporin®, CenBiot® and SUBTILPROBIO®), with probiotic effect on pigs, birds, calves and fish. However, the existence of biologically safe methodologies to obtain these products is not known. For this reason, a methodology for the isolation, identification and selection of strains of *Bacillus spp.* is suggested for the preparation of animal additives.

### Materials and Methods

The proposed methodology has three stages of study, which is conceived from the isolation of strains from different environments (table 1) and the evaluation under *in vitro* and *in vivo* conditions in birds.

The first stage of study has three experiments: isolation, identification and characterization and selection of strains under *in vitro* conditions. The second stage includes all the research carried out to show the capacity of growth and production of endospores

antibióticos como promotores del crecimiento (APC) en la producción animal (Furtula *et al.* 2013, Torres *et al.* 2013 y Pérez *et al.* 2015), la FAO y WHO (2002) definieron un grupo de requisitos y una metodología a seguir para obtener cepas de microorganismos que fueran reconocidas como seguras GRAS y que pudieran ser usadas en la elaboración de probióticos.

El establecimiento de estos criterios de selección de cepas con fines probióticos se considera una prioridad por la rápida incorporación de estos productos en el mercado. La mayor parte de las cepas que se utilizan para la elaboración de aditivos zootécnicos pertenecen al género *Lacto Bacillus spp.*, *Bifidobacterium*, las levaduras, fundamentalmente las del género *Saccharomyces* y *Bacillus spp.* en forma esporulada (García y Carcassés 2012 y Milián *et al.* 2014). Esta concepción está dada por el efecto probiótico que brindan en el balance de la microbiota intestinal, la activación del sistema inmune, la mejora de la fisiología digestiva y por ende, en los rendimientos productivos (Ayala *et al.* 2014, Milián *et al.* 2014 y Rodríguez 2015).

Investigaciones realizadas por Milián *et al.* (2014) demostraron la capacidad que tienen diferentes productos probióticos, obtenidos a partir de cepas autóctonas de *Bacillus subtilis*, para actuar en los procesos de recambio y mantenimiento celular, metabólico y microbiano, en el tracto gastrointestinal, principalmente a nivel del ciego.

Se conoce la existencia de la comercialización de productos elaborados a partir de cepas de *B. licheniformis*, *B. subtilis* y sus endosporas (BioPlus 2B®, Biostart®, Toyocerin®, Licalife®, Biosporin®, CenBiot® y SUBTILPROBIO®), con efecto probiótico en cerdos, aves, terneros y peces. Sin embargo, no se conoce la existencia de metodologías biológicamente seguras para la obtención de estos productos. Por ello, se propone una metodología para el aislamiento, identificación y selección de cepas de *Bacillus spp.* para la elaboración de aditivos zootécnicos.

### Materiales y Métodos

La metodología propuesta tiene tres etapas de trabajo, la que se concibe desde el aislamiento de cepas de diferentes ambientes (tabla 1) y las evaluaciones en condiciones *in vitro* e *in vivo* en aves.

La primera etapa de trabajo cuenta de tres experimentos: aislamiento, identificación y la caracterización y selección de las cepas en condiciones *in vitro*. La segunda etapa recoge toda la investigación realizada para demostrar la capacidad de crecimiento y producción de

Table 1. Code of *Bacillus spp.* strains isolated from different environments

Bovine feces	Content of the chickens caecum	Food wastes and other environments
Hb-1, Hb-2, Hb-3, Hb-4,	C-11, C-23, C-33, C-65, C-84,	Ms-1, Ms-2, Ms-3, PL-1,
Hb-5, Hb-6, Hb-7, Hb-8,	C-92, C-41, C-12, C-13, C-14,	PL-2, PL-3, PL-4 y E-44
Hb-9, Hb-10, Hb-11, Hb-12,	C-15, C-44, C-21, C-43, C-24,	
Hb-13, Hb-14, Hb-15 y Hb-16	C-25, C-22, C-91, C-32, C-31,	
	C-53, C-34, C-35 y C-55	

Hb = Feces, C= Caecum of birds (second number belongs to the animal), PL= food wastes, E=decayed tomato juice and Ms= of bovine Soil with slaughterhouse blood

compared to the traditional medium (TM) and a new culture medium for *Bacillus spp.* (McBs), from low-cost national resources, as well as, the study that shows the safety and biological quality of the strains worked as of the obtained animal additives and the third stage exposes the *in vivo* study in birds to demonstrate the effectiveness of the proposed methodology. The procedure is described in figure 1.

endosporas comparado con el medio tradicional (MT) y un nuevo medio de cultivo para *Bacillus spp.* (McBs), a partir de recursos nacionales de bajo costo, así como, el estudio que demuestra la seguridad y calidad biológica de las cepas trabajadas como de los aditivos zootécnicos obtenidos y la tercera etapa expone el estudio *in vivo* en aves para demostrar la efectividad de la metodología propuesta. Se describe el procedimiento en la figura 1.

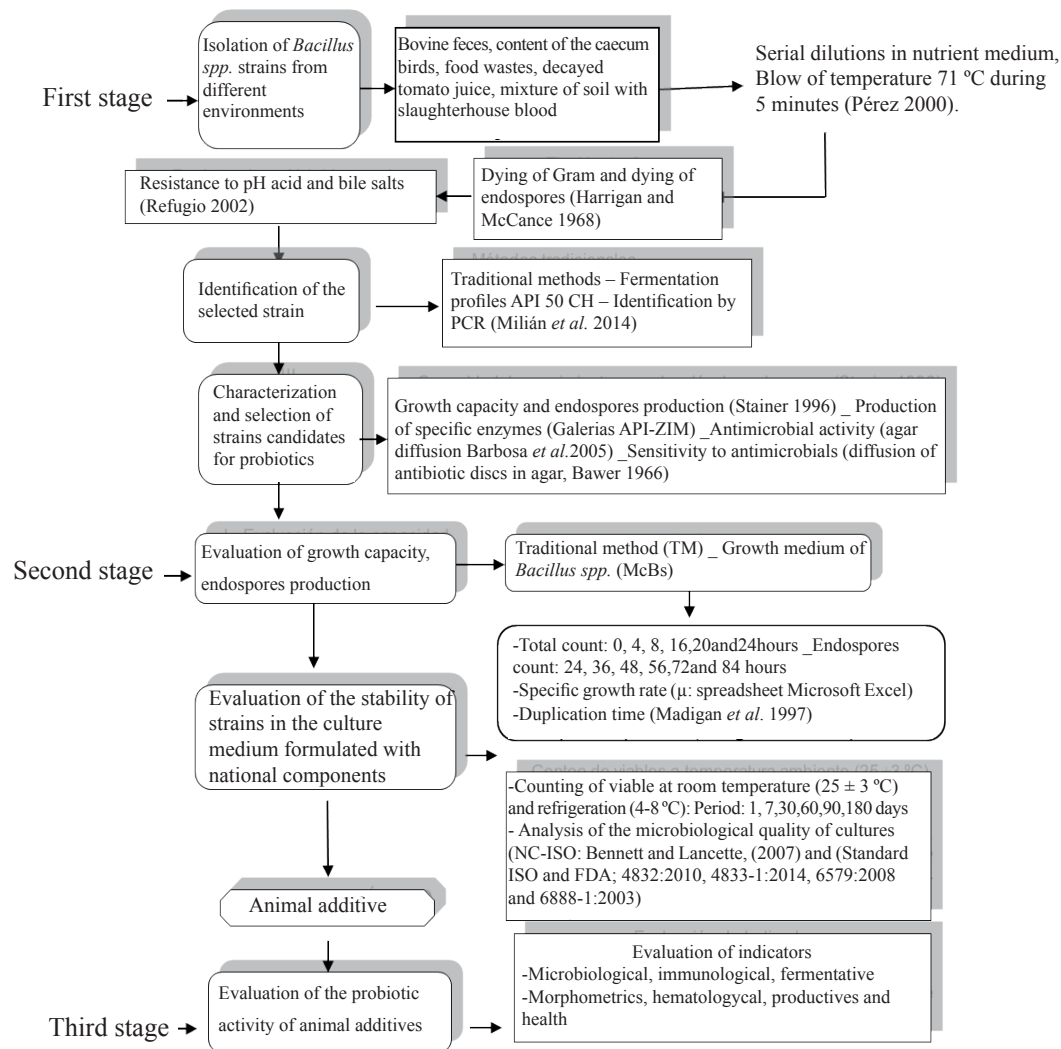


Figure 1. Experimental methodology for obtaining animal additives from *Bacillus spp.*

For the development of these stages, different culture media were used for the growth of strains. Also, methods of microbiological, chemical and statistical analysis were applied:

- Culture media
- Culture and counting of microorganisms
- Conservation of strains
- Statistical processing

*Culture media.* To carry out the isolation studies, evaluation of the probiotic activity, obtaining the animal additives and counts at the level of the caecum, it was worked with the culture media agar and nutrient media (BIOCEN).

The composition of the traditional medium of nutrient media (BIOCEN) per liter used is the following:

Para el desarrollo de estas etapas, se utilizaron diferentes medios de cultivo para el crecimiento de las cepas. Asimismo, se aplicaron métodos de análisis microbiológico, químico y estadístico:

- Medios de cultivo
- Cultivo y conteo de los microorganismos
- Conservación de las cepas
- Procesamiento estadístico

*Medios de cultivo.* Para llevar a cabo los estudios de aislamiento, evaluación de la actividad probiótica, obtención de los aditivos zootécnicos y conteos a nivel del ciego, se trabajó con los medios de cultivo agar y caldo nutriente (BIOCEN).

La composición del medio tradicional de caldo nutriente (BIOCEN) por litro utilizado es la siguiente: peptona

bacteriological peptone (5 g), nutritive extract (1 g), yeast extract (2 g) and sodium chloride (5 g). The solid medium was made with the addition of 15 g. L<sup>-1</sup> of bacteriological agar.

*Culture and counting of microorganisms.* The samples were collected and processed during the research and later resuspended in sterile saline solution. The vegetative forms were eliminated by thermal treatment at 71°C for 15 min (Pérez 2000). Serial dilutions were made (Stanier 1996) and plated in dishes with nutrient agar (BIOCEN). Incubation was performed at 37 °C for 24 h using an INNOVA NBS incubator under anaerobiosis conditions.

The microorganism count was carried out by the number of colony forming units (CFU). It was determined by visual counting of colonies on dishes with nutrient agar (Pelczar *et al.* 1966).

*Conservation of strains.* The isolated and identified strains were preserved in silica gel at a temperature of 4 °C, by lyophilization, with a program that varied the temperature from -20 °C at zero time to 15 °C at 48 h.

*Specific growth rate.* With the obtained data, the growth curves were made. By applying the fit line, the corresponding polynomials and the values of the specific growth rate ( $\mu$ ) were obtained. These procedures were executed using the Microsoft Excel spreadsheet.

*Duplication time.* The duplication time was calculated according to the formula described by Madigan *et al.* (1997).

$$dt = \mu / \text{Log } 2$$

where:

dt = duplication time

$\mu$  = specific growth rate

$$\text{Log } 2 = 0,301$$

*Statistical processing.* For the analysis of the data the INFOSTAT system, Version 1 (Di Rienzo *et al.* 2001) was used. The analysis of variance was performed to verify differences between the means, with significance level of  $P < 0.05$ . The Duncan test (1955) was applied to perform multiple comparisons between the means. The counts of viable microorganisms were transformed according to Log N to guarantee the normal conditions in the growth curve. For the analysis, the formula ( $K + N$ ) .10x was applied, where:

K is the constant that represents the logarithm of the dilution, in which the microorganism was inoculated

N is the logarithm CFU number

10 is the base of the logarithms

X is the dilution at which the inoculation was carried out

In case the count was equal to zero, a constant was added ( $x + 0.375$ ).

## Results and Discussion

In the evaluation of the proposed methodology, 100 strains were obtained. Of these, 48 exhibited characteristics of the Bacillus genus. All had Gram-

bacteriológica (5 g), extracto nutritivo (1 g), extracto de levadura (2 g) y cloruro de sodio (5 g). El medio sólido se elaboró con la adición de 15 g. L<sup>-1</sup> de agar bacteriológico.

*Cultivo y conteo de microorganismos.* Las muestras se recolectaron y procesaron durante la investigación y se resuspendieron posteriormente en solución salina estéril. Se eliminaron las formas vegetativas por tratamiento térmico a 71 °C durante 15 min (Pérez 2000). Se hicieron diluciones seriadas (Stanier 1996) y se sembraron en placas con agar nutriente (BIOCEN). La incubación se realizó a 37 °C durante 24 h en incubadora INNOVA NBS en condiciones de aerobiosis.

El conteo de microorganismos se realizó mediante el número de unidades formadoras de colonias (UFC). Se determinó por conteo visual de colonias en placas con agar nutriente (Pelczar *et al.* 1966).

*Conservación de las cepas.* Las cepas aisladas e identificadas se conservaron en sílica gel a temperatura de 4 °C, mediante liofilización, con un programa que varió la temperatura de -20 °C en tiempo cero hasta 15 °C a las 48 h.

*Velocidad específica de crecimiento.* Con los datos obtenidos se confeccionaron las curvas de crecimiento. Mediante la aplicación de la línea de ajuste se obtuvieron los polinomios correspondientes y los valores de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). Estos procedimientos se ejecutaron mediante la hoja de cálculo Microsoft Excel.

*Tiempo de duplicación.* El tiempo de duplicación se calculó según la fórmula descrita por Madigan *et al.* (1997).

$$td = \mu / \text{Log } 2$$

donde:

td = tiempo de duplicación

$\mu$  = velocidad específica de crecimiento

$$\text{Log } 2 = 0,301$$

*Procesamiento estadístico.* Para el análisis de los datos se utilizó el sistema INFOSTAT, Versión 1 (Di Rienzo *et al.* 2001). Los análisis de varianza se realizaron para verificar diferencias entre las medias, con nivel de significación de  $P < 0.05$ . La Prueba Duncan (1955) se aplicó para realizar las comparaciones múltiples entre las medias. Los conteos de microorganismos viables se transformaron según Log N para garantizar las condiciones de normalidad en la curva de crecimiento. Para el análisis, se aplicó la fórmula ( $K+N$ ).10x, 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

10 es la base de los logaritmos

X es la dilución a la que se efectuó la inoculación.

En caso de que el conteo fuera igual a cero se sumó una constante ( $x + 0.375$ ).

## Resultados y Discusión

En la evaluación de la metodología propuesta se obtuvieron 100 cepas. De ellas, 48 exhibieron características

positive bacillary cells and presence of endospores, characteristics that coincide with that described by Stanier (1996), Madigan *et al.* (1997) and Mayea *et al.* (1997).

The environments selected for the isolation of the strains are in correspondence with studies carried out by González *et al.* (2003), who isolated strains of *Lactobacillus bulgaris* and *Bacillus subtilis*, from decayed tomato juice, with the purpose of preparing a probiotic biopreparation for animal health. Sosa *et al.* (2004) isolated 52 sporulated strains, belonging to the *Bacillus spp.* genus of different samples of hen feces (19 %), goats (12 %), cattle, pigs and horses (7 %).

The 48 strains of *Bacillus spp.* evaluated with the three pH acids (1, 2 and 3) that were simulated *in vitro* for three hours, were able to endure pH-1, 33.3 %; pH-2, 55 % and pH-3, 96 %. The ability of the strains to resist low pH levels is necessary, since when using a microbial culture as a probiotic orally, it has to go through the action of the acid barrier of the stomach during its passage through the digestive tract where the pH can reach values of 2 (Milián *et al.* 2013). Hence the importance of that the microorganisms survive this chemical barrier so that they can reach the lower parts of the tract, where they develop their probiotic action.

For the results obtained in the selection process, it was decided to select strains C-31, C-34 and E-44 to continue their evaluation as possible microorganisms with probiotic activity under *in vitro* conditions.

The results of experiment II from Stage 1, which correspond to the identification by traditional methods (table 2, 3 and 4), show that the three strains evaluated are positive to the biochemical studies, while all were negative to growth under anaerobiosis conditions. With the use of the code Fields (1978) and the achieved results, these strains are located as belonging to the species *Bacillus subtilis* (Blackwood).

When the API 50 CH Gallery Test, specific for *Bacillus*, was applied, it was corroborated that the strains under study belong to the *Bacillus* genus and to the *subtilis* species with 99.7; 99.5 and 99.3 % of reliability, respectively. The result obtained by applying advanced molecular biology techniques, specifically the polymerase chain reaction (PCR), showed 100 % identity with that species. This confirms the validity and viability of the traditional methods, when confirming the identification by the traditional method, the carbohydrate fermentation

del género *Bacillus*. Todas presentaron células de forma bacilar Gram positivas y presencia de endosporas, características que coinciden con lo descrito por Stanier (1996), Madigan *et al.* (1997) y Mayea *et al.* (1997).

Los ambientes seleccionados para el aislamiento de las cepas están en correspondencia con estudios realizados por González *et al.* (2003), quienes aislaron cepas de *Lactobacillus bulgaris* y *Bacillus subtilis*, procedentes de jugo de tomate alterado, con el propósito de elaborar un biopreparado probiótico destinado la salud animal. Sosa *et al.* (2004) aislaron 52 cepas esporuladas, pertenecientes al género *Bacillus spp.* de diferentes muestras de heces de gallina (19 %), caprinos (12 %), vacunos, porcinos y equinos (7 %).

De las 48 cepas de *Bacillus spp.* evaluadas ante los tres pH ácidos (1, 2 y 3) que se simularon *in vitro* durante tres horas, fueron capaces de soportar a pH-1, 33.3 %; pH-2, 55 % y pH-3, 96 %. Es necesaria la capacidad de las cepas para resistir niveles bajos de pH, ya que cuando se utiliza un cultivo microbiano como probiótico por vía oral, se tiene que someter a la acción de la barrera ácida del estómago durante su tránsito por el tracto digestivo, donde el pH puede alcanzar valores de 2 (Milián *et al.* 2013). De ahí la importancia de que los microorganismos sobrevivan a esta barrera química para que puedan alcanzar las partes bajas del tracto, donde van a desarrollar su acción probiótica.

Por los resultados obtenidos en el proceso de selección, se decide seleccionar las cepas C-31, C-34 y E-44 para continuar su evaluación como posibles microorganismos con actividad probiótica en condiciones *in vitro*.

Los resultados del experimento II de la Etapa 1, que corresponden a la identificación por métodos tradicionales (tabla 2, 3 y 4), evidencian que las tres cepas evaluadas son positivas a los estudios bioquímicos, mientras que todas fueron negativas al crecimiento en condiciones de anaerobiosis. Con la utilización de la clave Fields (1978) y los resultados logrados, se ubica a estas cepas como pertenecientes a la especie *Bacillus subtilis* (Blackwood).

Cuando se aplicó el Test de Galería API 50 CH, específico para *Bacillus*, se corroboró que las cepas en estudio pertenecen al género *Bacillus* y a la especie *subtilis* con 99.7; 99.5 y 99.3 % de confiabilidad, respectivamente. El resultado que se obtuvo al aplicar técnicas avanzadas de biología molecular, específicamente la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), mostraron 100 % de identidad con esa especie. Esto permite confirmar la vigencia y viabilidad de los métodos tradicionales, al confirmarse la identificación

Table 2. Performance of strains to different biochemical tests

Strains	Ca	Cs	A	P.I	R.N	V.P	U.c
C-31	+	+	+	+	+	+	+
C-34	+	+	+	+	+	+	+
E-44	+	+	+	+	+	+	+

Ca: Catalase production, Cs: Casein hydrolysis, A: Starch hydrolysis, P.I: Indole production, R.N: Nitrate reduction, V.P: Voges Proskauer test, Uc: Citrate use.

Table 3. Performance of strains to different biochemical tests

Strains	Temperature (° C)			pH				Na Cl (%)			Anae
	45	50	65	6	7	7.5	8	2	4	7	
C-31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
C-34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
E-44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Temperature 45, 50 and 65 °C: Growth of strains at different temperature levels, pH: Growth at pH 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, NaCl: Growth in sodium chloride at 2, 4 and 7 %, Anae: Growth in anaerobiosis.

Table 4. Performance of *Bacillus spp.* strains to different carbohydrates

Strains	Glucose	Fructose	Lactose	Xylose	Mannitol
C-31	A	A	A	A	A
C-34	A	A	A	A	A
E-44	A	A	A	A	A

A: Acid production, change of coloration to yellow.

profiles and the PCR (Milián *et al.* 2014).

The studies carried out to verify the efficiency of the methodology in the first stage, experiment III, show that the strains C-31, C-34 and E-44 have high capacity for growth and production of endospores, and that they exhibit the best characteristics in regarding the antimicrobial activity against 15 strains of Gram positive and Gram negative microorganisms. In studies with 25 antibiotics showed to be sensitive, reason why it can be affirmed that the selected strains (C-31, C-34 and E-44) of *Bacillus subtilis* show *in vitro* potential characteristics for their use as probiotics.

The second stage of the methodology includes the researches related to the evaluation of growth capacity, endospore production and stability of strains in a new culture medium, formulated with national and low cost components (table 5 and 6).

The obtained results showed that the strains C-31, C-34 and E-44 in the new culture medium (figures 2, 3 and 4; tables 8, 9 and 10) for *Bacillus subtilis* (McBs) increased the growth dynamics and its speed, as well as the duplication time (table 7).

The best results regarding the growth rate of strains C-31, C-34 and E-44 were in the new growth medium for *Bacillus subtilis* (McBs). This is due to two elements: the low cost of obtaining it and the composition of the new culture medium formulated with national components: final molasses as a carbon

por el método tradicional, los perfiles de fermentación de carbohidratos y la RCP (Milián *et al.* 2014).

Los estudios realizados para verificar la eficiencia de la metodología en la primera etapa, experimento III, demuestran que las cepas C-31, C-34 y E-44 poseen alta capacidad de crecimiento y producción de endosporas, y que exhiben las mejores características en cuanto a la actividad antimicrobiana ante 15 cepas de microorganismos Gram positivos y Gram negativos. En estudios con 25 antibióticos mostraron ser sensibles, por lo que se puede afirmar que las cepas seleccionadas (C-31, C-34 y E-44) de *Bacillus subtilis* muestran *in vitro* características potenciales para su utilización como probióticas.

La segunda etapa de la metodología recoge las investigaciones relacionadas con la evaluación de la capacidad de crecimiento, producción de endosporas y estabilidad de las cepas en un nuevo medio de cultivo, formulado con componentes nacionales y de bajo costo (tabla 5 y 6).

Los resultados obtenidos mostraron que las cepas C-31, C-34 y E-44 en el nuevo medio de cultivo (figuras 2, 3 y 4; tablas 8, 9 y 10) para *Bacillus subtilis* (McBs) aumentaron la dinámica de crecimiento y su velocidad, así como el tiempo de duplicación (tabla 7).

Los mejores resultados referentes a la velocidad de crecimiento de las cepas C-31, C-34 y E-44 fueron en el nuevo medio de crecimiento para *Bacillus subtilis* (McBs). Esto está dado por dos elementos: el bajo costo de su

Table 5. Composition of the new medium for the *Bacillus subtilis* growth

Medium for the <i>Bacillus subtilis</i> (McBs) growth	
Composition	Units. L <sup>-1</sup>
Final molasses (50 % TRS)	50 g (25 g TRS)
Yeast hydrolyzate (18 % TN)	50 mL (0.9 TN)
Bacteriological peptone	3 g (0.22 TN)
CaCl <sub>2</sub>	0.01 g

pH 7.0 and incubation temperature 37 °C., TRS: total reducing sugars and TN: Total nitrogen

Table 6. Production cost of biopreparations under laboratory conditions

Row matters and elements		MU	Cost CUP	Cost USD	Quantity	Cost CUP	Cost USD
Components of the Biopreparation	Final molasses	1000 kg	60.00	-	0.225 kg	0.072	-
	Yeast hydrolyzate	1L	0.03	0.05	0.225 L	0.036	0.06
	Calcium chloride	500 g	-	12.50	0.1 g	-	0.071
	Bacteriological peptone	500 g	-	24.22	18 g	-	2.325
Cost		-	-	-	-	0.11	2.46
Elements of the process							
Energy		-	-	-	-	1.07	-
Salary		-	-	-	-	9.52	-
Depreciation		-	-	-	-	-	0.28
Social Security		-	-	-	-	1.02	-
Total (5 L)						11.71	2.73
Total (1 L)						2.34	0.54

MU: measurement unit; CUP: price in Cuban pesos of the used reagents; USD: price in American dollars of the used reagents; Quantity: the amount of kg, L and g that were used for the 5 L; amount in CUP and USD: total price for each reagent used in the preparation of the 5 L of biopreparation.

Table 7. Dynamics of total count of strains C-31, C-34 and E-44 in the culture media TM and McBs.

Strains	Time (h)	Culture media		SE± Sign
		Log CFU.mL <sup>-1</sup> TM	Log CFU.mL <sup>-1</sup> McBs	
C-31	0	6.48	6.45	0.06
	4	6.94	8.66	0.03***
	8	8.55	10.58	0.03***
	12	10.53	13.76	0.03***
	16	12.52	14.83	0.03***
	20	12.79	14.91	0.02***
	24	12.93	14.96	0.01***
C-34	0	6.30	6.50	0.07
	4	6.92	8.67	0.02***
	8	8.59	10.63	0.02***
	12	10.60	13.77	0.01***
	16	12.51	14.81	0.04***
	20	12.74	14.90	0.03***
	24	12.92	14.96	0.01***
E-44	0	6.43	6.57	0.06
	4	6.93	8.69	0.03***
	8	8.60	10.59	0.02***
	12	10.55	13.74	0.03***
	16	12.56	14.82	0.03***
	20	12.73	14.93	0.02***
	24	12.69	14.98	0.17***

The treatments differ to P<0.05 (Duncan 1955), \*\*\* P<0.001

source, which provides glucose, fructose and sucrose (Pérez 2000) and the alcohol distiller's yeast cream hydrolyzate, as a nitrogen source, which provides glucan oligosaccharides (1.30 mg, mL<sup>-1</sup>) and mananos (0.86 mg, mL<sup>-1</sup>), proteins, amino acids and vitamins of the B and K complex (Pérez *et al.* 2016). The

obtención y la composición del nuevo medio de cultivo formulado con componentes nacionales: miel final como fuente de carbono, que aporta glucosa, fructosa y sacarosa (Pérez 2000) y el hidrolizado de crema de levadura de destilería de alcohol, como fuente de nitrógeno, que proporciona oligosacáridos de glucanos (1.30 mg. mL<sup>-1</sup>)

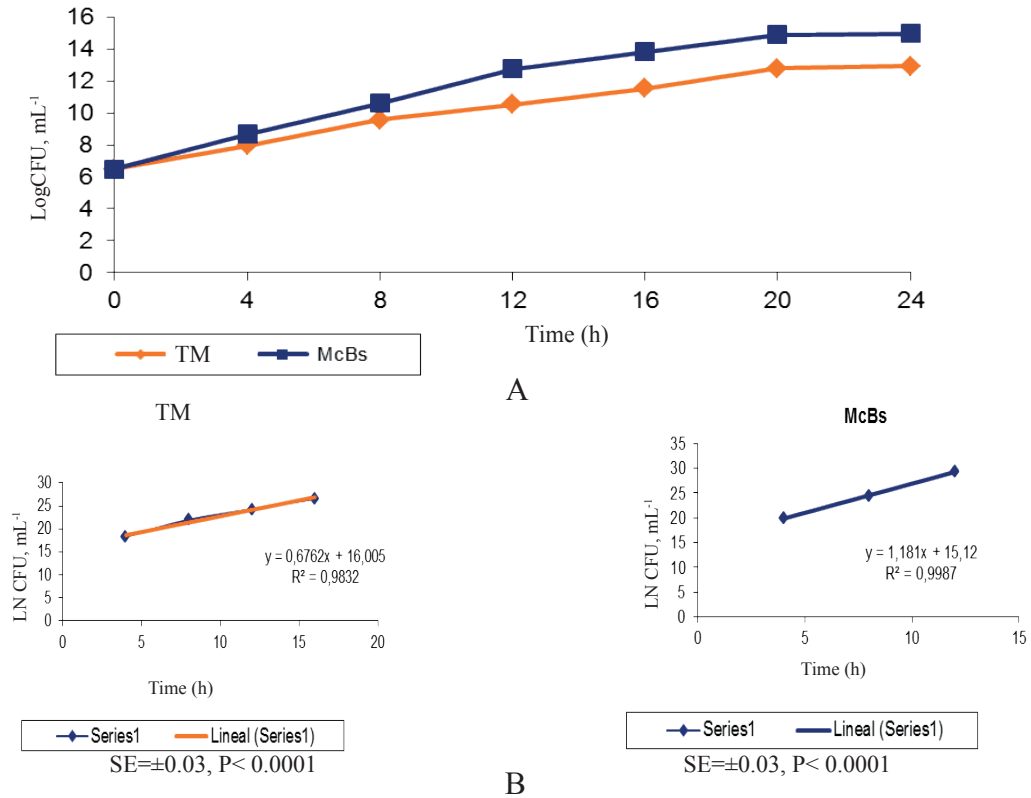


Figure 2. Performance of the C-31 strain in the traditional medium and growth medium for *Bacillus subtilis*: (A) growth dynamic and (B) growth rate, (SE± Sign)

Table 8. Specific growth rate and duplication time of the *Bacillus subtilis* strain C-31 in the TM and McBs media.

Strain	Culture media	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ) SE	R <sup>2</sup> (%)	SE ± Model	Dt (h)
C-31	TM	0.67± 0.78	98	0.03	1.02± 0.78
	McBs	1.18± 0.88	99		0.58± 0.88

$\mu$ =specific growth rate, R<sup>2</sup>= determination coefficient and Dt= duplication time

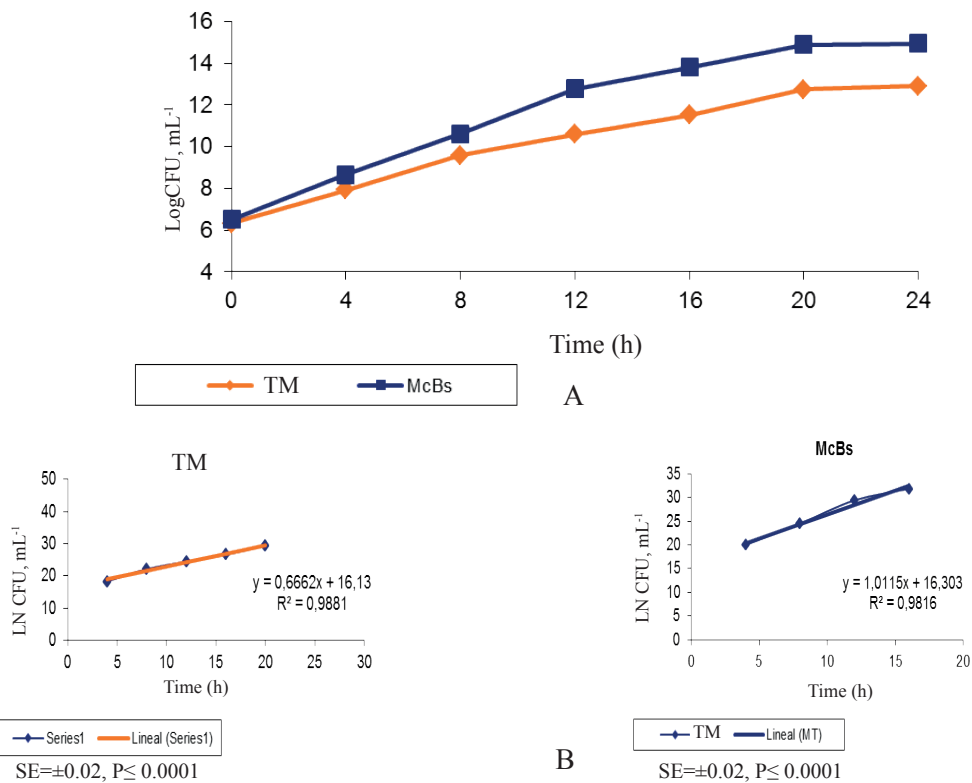


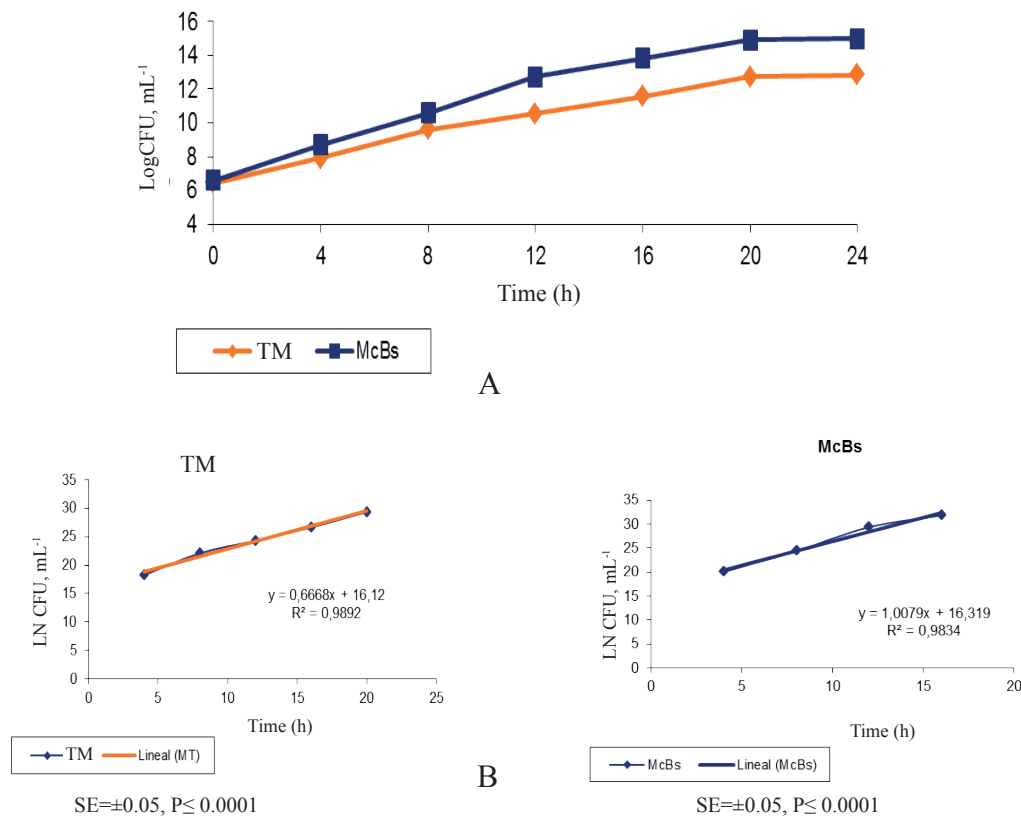
Figure 3. Performance of the C-31 strain in the traditional medium and growth medium for *Bacillus subtilis*: (A) growth dynamic and (B) growth rate, (SE± Sign)



Table 9. Specific growth rate and duplication time of the *Bacillus subtilis* strain C-34 in the TM and McBs media.

Strain	Culture media	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ) SE	R <sup>2</sup> (%)	SE $\pm$ Model	Dt (h)
C-34	TM	0.66 $\pm$ 0.88	98	0.02	1.04 $\pm$ 0.88
	McBs	1.01 $\pm$ 0.98	98		0.68 $\pm$ 0.98

$\mu$ =specific growth rate, R<sup>2</sup>= determination coefficient and Dt= duplication time

Figure 4. Performance of the E-44 strain in the traditional medium and growth medium for *Bacillus subtilis*: (A) growth dynamic and (B) growth rateTable 10. Specific growth rate and duplication time of the *Bacillus subtilis* strain E-44 in the TM and McB media.

Strain	Culture media	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ) SE	R <sup>2</sup> (%)	EE $\pm$ Model	Dt (h)
E-44	MT	0.66 $\pm$ 0.80	98	0.05	1.03 $\pm$ 0.80
	McBs	1.00 $\pm$ 0.90	98		0.68 $\pm$ 0.90

$\mu$ =specific growth rate, R<sup>2</sup>= determination and Dt= duplication time

bacteriological peptone that was used in the medium incorporated nucleic acids, minerals, vitamins, carbohydrates and proteins, which makes it a rich and viable medium for the growth of microorganisms (Herrera *et al.* 2014). These nutrients allow the accelerated growth of *Bacillus subtilis* cultures in the first hours of culturing and high production of endospores from high microbial growth (Milián 2009 and Rodríguez 2010).

The sporulated biopreparations, obtained at laboratory level, showed stability up to 180 d, at room temperature and in refrigeration. The microbiological quality study showed that the biopreparations, in both conservation methods, were free of contaminants, such as the recount

y mananos (0,86 mg. mL<sup>-1</sup>), proteínas, aminoácidos y vitaminas del complejo B y K (Pérez *et al.* 2016). La peptona bacteriológica que se usó en el medio incorporó ácidos nucleicos, minerales, vitaminas, carbohidratos y proteínas, lo que lo hace un medio rico y viable para el crecimiento de los microorganismos (Herrera *et al.* 2014). Estos nutrientes permiten el crecimiento acelerado de cultivos de *Bacillus subtilis* en las primeras horas de cultivo y elevada producción de endosporas a partir del alto crecimiento microbiano (Milián 2009 y Rodríguez 2010).

Los biopreparados esporulados, obtenidos a nivel de laboratorio, mostraron estabilidad hasta los 180 d, a temperatura ambiente y en refrigeración. El estudio de calidad microbiológica demostró que los

of fecal and total coliforms, *Pseudomonas auruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Salmonella spp.*

In the third stage of the methodology, the evaluation of the probiotic activity of different animal additives in birds is proposed. These were supplied during a period of 42 d and showed positive results in the microbial balance in the caecum of chickens, which is reflected by the increase in the population of *Lactobacillus*, endospores and total anaerobes, as well as by the reduction in the coliform group, increase in total and fractionated short chain fatty acid (SCFA) and lactic acid contents, with a decrease in intestinal pH levels. Improvements were made in indicators related to the immunological response of birds, such as the size of the Bursa of Fabricius and the spleen, as well as the HI titres for the Newcastle vaccine; in addition to the levels of hemoglobin, hematocrit, albumin, globulin and total proteins. This translates into an increase in live weight, lower intake, better conversion and higher food efficiency.

Finally, it was proved that the methodology proposed for the isolation, identification and selection of *Bacillus spp.* strains, destined to the elaboration of animal additives from the cultures C-31, C-34 and E-44 of *Bacillus subtilis* and its endospores can be used in Cuba, since they gain a large space as enhancers of microbial balance and immune, physiological and productive responses. They also allow obtaining new biopreparations with probiotic activity that, at present, are a promising alternative between the use of antibiotics as growth promoters, taking into account that they are obtained from national raw matters that come from the sugar industry and therefore have low cost. In addition, they have the characteristic of sporulating, which is intrinsic to the *Bacillus*, which makes them a tempting product, given the conditions of intensive production in Cuba.

biopreparados, en ambos métodos de conservación, estaban libres de contaminantes, tales como el recuento de coliformes fecales y totales, *Pseudomonas auruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Salmonella spp.*

En la tercera etapa de la metodología se propone la evaluación de la actividad probiótica de los diferentes aditivos zootécnicos en aves. Estos se suministraron durante un período de 42 d y mostraron resultados positivos en el balance microbiano en el ciego de pollos, lo que se refleja por el incremento en la población de *Lactobacillus*, endosporas y anaerobios totales, así como por la reducción en el grupo coliformes, incremento de los contenidos de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) totales y fraccionados y de ácido láctico, con disminución en los niveles de pH intestinal. Se lograron mejorar indicadores relacionados con la respuesta inmunológica de las aves, como el tamaño de la bolsa de Fabricio y del bazo, así como los títulos de HI para la vacuna de Newcastle; además de los niveles de hemoglobina, hematocrito, albúmina, globulina y proteínas totales. Esto se traduce en incremento del peso vivo, menor consumo, mejor conversión y mayor eficiencia alimentaria.

Finalmente, se comprobó que la metodología propuesta para el aislamiento, identificación y selección de cepas de *Bacillus spp.*, destinadas a la elaboración de aditivos zootécnicos a partir de los cultivos C-31, C-34 y E-44 de *Bacillus subtilis* y sus endosporas se pueden usar en Cuba, ya que ganan un gran espacio como mejoradores del balance microbiano y de las respuestas inmunológicas, fisiológicas y productivas. Permiten además, obtener nuevos biopreparados con actividad probiótica que, en los momentos actuales, son una alternativa prometedora ante el empleo de antibióticos como promotores del crecimiento, si se tiene en cuenta que los mismos se obtienen a partir de materias primas nacionales que provienen de la industria azucarera y por ende, tienen bajo costo. Además, poseen la característica de esporular, que es intrínseca de los *Bacillus*, lo que las hace un producto tentador, dada las condiciones de producción intensiva en Cuba.

### Referencés

- Ayala, L., Bocourt, R., Castro, M., Dihigo, L. E., Milián, G., Herrera, M. & Ly, J. 2014. "Development of the digestive organs in piglets born from sows consuming probiotic before farrowing and during lactation". Cuban Journal of Agricultural Science, 48(2): 133–136, ISSN: 2079-3480.
- Barbosa, T., Claudia, R.S., LaRagione, R., Martí, J.W. & Adriano, H.O. 2005. "Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract". Applied and Environmental Microbiology. 71 (2):968-978
- Bawer, A., Kirvy, M., Sherris, J. & Turck, M. 1996. "Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method." J. American of Clinical Pathological. 45:493-496.
- Bannett, R.W. & Lancette, G.A. 2007. Food and Drug Administration (FDA). Bacteriological Analytical Manual. Available: <http://www.fda.gov/oc/Spanish/> [Consulted: January, 2007]
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2001. InfoStat. version 2001, [Windows], Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, Available: <<http://www.infostat.com.ar/>>.
- Duncan, D. B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". Biometrics, 11(1): 1–42, ISSN: 0006-341X, DOI: 10.2307/3001478.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) & WHO (World Health Organization) 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Ontario, Canada: FAO - WHO, 11 p., Available: <[http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)>, [Consulted: June 20, 2017].
- Fields, M. 1978. Metodos para el estudio de las bacterias esporuladas termofilas de interes en las industrias alimentarias y sanitarias. 1st ed., Zaragoza, España: Acribia S.A., 250 p., ISBN: 978-84-200-0389-4, Available: <<http://www.agapea.com/libros/Metodos-para-el-estudio-de-las-bacterias-esporuladas-termofilas-de-interes-en-las-industrias-alimentarias-y-sanitarias-9788420003894-i.htm>>, [Consulted: May 15, 2017].

- Furtula, V., Jackson, C. R., Farrell, E. G., Barrett, J. B., Hiott, L. M. & Chambers, P. A. 2013. "Antimicrobial Resistance in *Enterococcus spp.* Isolated from Environmental Samples in an Area of Intensive Poultry Production". International Journal of Environmental Research and Public Health, 10(3): 1020–1036, ISSN: 1660-4601, DOI: 10.3390/ijerph10031020.
- García, M. & Carcassés, A. 2012. Empleo de probióticos en los animales. Engormix, Available: <<http://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/empleo-probioticos-animales-t29474.htm>>, [Consulted: May 15, 2017].
- González, B. E., Gómez, M. & Jiménez, Z. 2003. "Bacteriocinas de probióticos". Revista Salud Pública y Nutrición, 4(2), ISSN: 1870-0160, Available: <<http://www.medigraphic.com/pdfs/revsalpubnut/spn-2003/spn032g.pdf>>, [Consulted: May 15, 2017]
- Harrigan, W.F. & Mc Caxce, M. 1968. Métodos de laboratorio en Microbiología. Ed. Academia, España.
- Herrera, E., Murillo, M., Berumen, L., Páez, J. & Villarreal, G. 2014. "Efecto de *Sacharomyces cerevisiae* y *Kluyveromices marxianus* durante el tiempo de fermentación en la calidad nutritiva del nopal forrajero". Ecosistemas y recursos agropecuarios, 1(1): 33–40, ISSN: 2007-9028.
- NS-ISO 4832:2010. Microbiología de los Alimentos de Consumo Humano y Animal. Método horizontal para la enumeración de coliformes. Método dereferencio.
- NS-ISO 4833:2014. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la enumeración de microorganismos. Parte1: Conteo de colonias a 30C por la técnica de placa vertida.
- NS-IOS 6579:2008. Microbiología de los Alimentos de Consumo Humano y Animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella spp.*
- NS-IOS 6888-1:2003. Enumeración de staphylococcus coagulasa positiva. Parte 1. Técnica utilizando el medio Agar Baibel Parker
- Madigan, M. ., Martinko, J. . & Parker, J. 1997. Brock biology of microorganisms. Upper Sadle River, N.J.: Prentice Hall, 986 p., ISBN: 978-0-13-571225-2.
- Mayea, S. S., Carone, M. D., Novo, R. S., Sardiñas, B. I., Silveira, E. P., Arteaga, M. S., Gómez, M. Y. & Valiño, A. A. 1997. Microbiología Agropecuaria. vol. 1, La Habana, Cuba: Félix Varela, 15-52 p., ISBN: 978-959-07-0127-6.
- Milián, G. 2009. Obtención de cultivos de *Bacillus spp.* y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (*Gallus gallus domesticus*). Ph.D. Thesis, Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba, 100 p.
- Milián, G., Rondón, A. J., Pérez, M., Bocourt, R., Rodríguez, Z. & Ranilla, M. J. 2013. "Evaluation of *Bacillus subtilis* biopreparations as growth promoters in chickens". Cuban Journal of Agricultural Science, 47(1): 61–66, ISSN: 2079-3480.
- Milián, G., Rondón, A. J., Pérez, M., Samaniego, L. M., Riaño, J., Bocourt, R., Ranilla, R., Carro, M. D., Rodríguez, M. & Laurencio, M. 2014. "Isolation and identification of strains of *Bacillus spp.* in different ecosystems, with probiotic purposes, and their use in animals". Cuban Journal of Agricultural Science, 48(4): 347–351, ISSN: 2079-3480.
- Pelczar, M. J., Reid, R. D. & Aguilar-Bartolomé, F. 1966. Microbiologia. Mexico: McGraw-Hill, 664 p.
- Pérez, M. 2000. Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica. Ph.D. Thesis, Universidad Agraria de La Habana, Cuba, 100 p.
- Pérez, M., Milián, G., Rondón, A. J., Bocourt, R. & Torres, V. 2015. "Efecto de endosporas de *Bacillus subtilis* E-44 con actividad probiótica sobre indicadores fermentativos en órganos digestivos e inmunológicos de pollos de engorde". Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 35(2): 89–94, ISSN: 1315-2556.
- Pérez, M. P., Milián, G. F., Boucourt, R. S. & Reynaldo, A. P. 2016. "In vitro evaluation of prebiotics in hydrolysates of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) prepared by different methods". Revista La Técnica, 16: 64–75, ISSN: 1390-6895, 2477-8982.
- Refugio, T.V.2002. Flora intestinal, prebióticos y salud. In: VII Taller Internacional sobre calidad sanitaria. Evaluación y Conservación de Alimentos, La Habana, Cuba.
- Rodríguez, M. 2010. Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. M.Sc. Thesis, Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba, 75 p.
- Rodríguez, Y. M. de O. 2015. Evaluación del efecto probiótico de los aditivos zootécnicos PROBIOLACTIL© y SUBTILPROBIO© en cerdos. Graduated Thesis, Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba, 50 p.
- Sosa, B. M., Castillo, C. C. & Scorza, J. 2004. "Actividad inhibitoria de cepas del género bacillus sp. contra dermatofitos". Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 24(1–2): 59–64, ISSN: 1315-2556.
- Stanier, R. S. 1996. Microbiología. 2nd ed., España: Reverte, 750 p., ISBN: 978-84-291-1868-1.
- Torres, C., Carcelén, F., Ara, M., San Martín, F., Jiménez, R., Quevedo, W. & Rodríguez, J. 2013. "Effect of supplementation of a probiotic strain on the productive performance of the guinea pig (*Cavia porcellus*)". Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 24(4): 433–440, ISSN: 1682-3419.