

## Stability of the zootechnical additives SUBTILPROBIO® C-31, C-34 and E-44 under different temperature conditions

### Estabilidad de los aditivos zootécnicos SUBTILPROBIO® C-31, C-34 y E-44 en diferentes condiciones de temperatura

Grethel Milián<sup>1</sup>, Ana J. Rondón<sup>1</sup>, M. L. Pérez<sup>2</sup>, Yordany Martínez<sup>1</sup>, R. Boucourt<sup>4</sup>,  
Marlen Rodríguez<sup>1</sup>, A. Beruvides<sup>1</sup> and Yadileiny Portilla<sup>3</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>Universidad Autónoma de España, Madrid, España.

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

Email: grethel.milian@umcc.cu

In intensive livestock production, not all storage conditions are available for the conservation of biological products. Hence, the objective of this research was to verify the stability of three zootechnical additives: SUBTILPROBIO® C-31, C-34 and E-44 at room temperature ( $24 \pm 3$  °C) and in refrigeration ( $4 \pm 8$  °C). For this, three experiments were carried out: 1) microbiological quality of the additives, 2) viability of the endospores and 3) pH dynamics. The results revealed the absence of contaminating microorganisms in the additives, such as fecal and total coliforms, *Pseudomonas auruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, Salmonella. The count of yeasts ( $<10^3$  mL) and fungi ( $<10$  CFU.mL<sup>-1</sup>), acceptable for products of animal consumption. The viability of endospores showed no difference in both temperatures (16 Log CFU.mL<sup>-1</sup>). However, the pH showed differences ( $P < 0.05$ ) between the initial hour and the seventh day for both temperatures [environment: C-31: 6.38 / 5.70; C-34: 6.38 / 5.74; E-44: 6.38 / 5.77 and refrigeration: C-31: 6.38 / 4.52; C-34: 6.38 / 4.50; E-44: 6.38 / 4.49]. It can be concluded that there is no difference for both temperatures, which makes viable the preservation of zootechnical additives SUBTILPROBIO® C-31, C-34 and E-44 in both conditions.

Key words: *conservation of biological products, Bacillus subtilis, viability of endospores*

Currently, some studies have been performed to achieve good practices that guarantee a better use of food by animals in order to increase productivity (Toledo *et al.* 2018). Within these practices, it can be found the administration of safe and stable microorganisms to increase resistance to diseases and improve the nutritional state of animals. Probiotics are postulated as a potential replacement alternative to antibiotics used as subtherapeutics, as growth promoters. Its advantage is that they do not leave residues in the eggs or in the meat of birds and do not generate a risk of antibiotic resistance in the human microbiota (Arteaga *et al.* 2018). However, they have the disadvantage of high prices and stability over time (Pérez and Sablón 2017).

The choice of an appropriate conservation method is important to keep intact the characteristics of any biological product and suitability (Caicedo and Valle 2017). The existence of different methods of

En la producción intensiva pecuaria no se cuenta con todas las condiciones de almacenamiento para la conservación de productos biológicos. De ahí que se propone como objetivo de esta investigación verificar la estabilidad de tres aditivos zootécnicos: SUBTILPROBIO® C-31, C-34 y E-44 a temperatura ambiente ( $24 \pm 3$  °C) y en refrigeración ( $4 \pm 8$  °C). Para ello se realizaron tres experimentos: 1) calidad microbiológica de los aditivos, 2) viabilidad de las endosporas y 3) dinámica de pH. Los resultados obtenidos revelaron la no presencia de microorganismos contaminantes en los aditivos, tales como coliformes fecales y totales, *Pseudomonas auruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, Salmonella. El conteo de levaduras ( $<10^3$  mL) y hongos ( $<10$  UFC.mL<sup>-1</sup>), permisibles para productos de consumo animal. La viabilidad de endosporas no mostró diferencias en ambas temperaturas (16 Log UFC.mL<sup>-1</sup>). Sin embargo, el pH arrojó diferencias ( $P < 0.05$ ) entre la hora inicial y el séptimo día para ambas temperaturas [ambiente: C-31: 6.38/5.70; C-34: 6.38/5.74; E-44: 6.38/5.77 y refrigeración: C-31: 6.38/4.52; C-34: 6.38/4.50; E-44: 6.38/4.49]. Se concluye que no existe diferencia para ambas temperaturas, lo que hace viable la conservación de los aditivos zootécnicos SUBTILPROBIO® C-31, C-34 y E-44 en ambas condiciones.

Palabras clave: *conservación de productos biológicos, Bacillus subtilis, viabilidad de endosporas*

En la actualidad se trabaja por lograr buenas prácticas que garanticen un mejor aprovechamiento de los alimentos por parte de los animales con el fin de incrementar la productividad (Toledo *et al.* 2018). Dentro de estas prácticas se encuentra la administración de microorganismos seguros y estables para aumentar la resistencia a enfermedades y mejorar el estado nutricional de los animales. Los probióticos se postulan como una alternativa potencial de reemplazo a los antibióticos utilizados como subterapéuticos, a modo de promotores de crecimiento. Su ventaja es que no dejan residuos en los huevos ni en la carne de las aves y no generan riesgo de resistencia antibiótica en la microbiota humana (Arteaga *et al.* 2018). Sin embargo tienen como desventaja sus altos precios y estabilidad en el tiempo (Pérez y Sablón 2017).

La elección de un método adecuado de conservación, resulta importante para mantener intactas las características de cualquier producto biológico e idoneidad (Caicedo y Valle 2017). Se conoce de la existencia de diferentes

preservation of products with probiotic effect are known, such as lyophilization, microencapsulation and spray drying, among others, in order to maintain its extrinsic characteristics (Zhang *et al.* 2015 and Rueda *et al.* 2016). According to Rodríguez *et al.* (2016) and Molina (2016), one of the elements that affect the survival of microorganisms and conservation over time is temperature and pH. These two indicators are reported as methods of conserving viability of biological products (Montañez and Castro 2006). Hence, the objective of this research was to verify the stability of the SUBTILPROBIO® C-31, C-34 and E-44 zootechnical additives under conditions of refrigeration and room temperature.

### Materials and Methods

*Production of zootechnical additives.* Zootechnical additives were obtained at the Centro de Estudios Biotecnológicos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, University of Matanzas. The methodology proposed by Milián *et al.* (2017b) was used. C-31, C-34 and E-44 strains of *Bacillus subtilis*, *subtilis* subspecies, were used, which were isolated and identified by Milián *et al.* (2014).

To verify the stability of these zootechnical additives at room temperatures ( $24 \pm 3$  °C) and in refrigeration ( $4 \pm 8$  °C), the rack test was carried out, and 15 bottles of both temperatures were taken and the following parameters were measured:

1. *Microbiological quality of the additives.* To confirm the microbiological quality of zootechnical additives SUBTILPROBIO® C-31, C-34 and E-44 for their use in animals, counting of contaminating microorganisms was carried out according to the regulations in force, described for the Microbiological quality studies of the NC-ISO Human and Animal Consumption Foods according to Bennett and Lancette (2007) (table 1). This sampling was done in both temperatures, and they were taken at the beginning (1st day) and end of the experiment (180 days).

métodos de conservación de productos con efecto probióticos como son la liofilización, microencapsulación, y el secado por aspersión, entre otras, con el fin de mantener sus características extrínsecas (Zhang *et al.* 2015 y Rueda *et al.* 2016). Según Rodríguez *et al.* (2016) y Molina (2016) uno de los elementos que afecta la supervivencia de los microorganismos y conservación en el tiempo es la temperatura y el pH. Estos dos indicadores se reportan como métodos de conservar la viabilidad de productos biológicos (Montañez y Castro 2006). De ahí que el objetivo de esta investigación consistió en verificar la estabilidad de los aditivos zootécnicos SUBTILPROBIO® C-31, C-34 y E-44 en condiciones de temperatura ambiente y refrigeración.

### Materiales y Métodos

*Producción de los aditivos zootécnicos.* Los aditivos zootécnicos se obtuvieron en el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Matanzas. Se siguió la metodología propuesta por Milián *et al.* (2017b). Se trabajó con las cepas C-31, C-34 y E-44 de *Bacillus subtilis* sub especie *subtilis* aislada e identificadas por Milián *et al.* (2014).

Para verificar la estabilidad de estos aditivos zootécnicos a temperaturas ambiente ( $24 \pm 3$  °C) y en refrigeración ( $4 \pm 8$  °C), se hizo la prueba de estante, se tomaron 15 frascos de ambas temperaturas y se procedió a medir los siguientes parámetros:

1. *Calidad microbiológica de los aditivos.* Para aseverar la calidad microbiológica de los aditivos zootécnicos SUBTILPROBIO® C-31, C-34 y E-44 para su uso en animales, se procedió al conteo de microorganismos contaminantes según las normas vigentes, descritas para los estudios de calidad Microbiológica de los Alimentos de Consumo Humano y Animal NC-ISO según Bennett y Lancette (2007) (tabla 1). Este muestreo se realizó en ambas temperaturas, las muestras fueron tomadas al inicio (1er día) y final del experimento (180 días).

Table 1. Microbiological tests for determining contaminant microorganisms

Microbiological tests	Reference NC- ISO
Recount of total and fecal coliforms	4832: 2010
Recount of <i>Pseudomonas auruginosa</i>	4833-1: 2014
Recount of <i>Staphylococcus aureus</i>	6888-1: 2003
Recount of <i>Bacillus cereus</i>	4833-1: 2014
Counting of Salmonella in 25 mL	6579: 2008
Counting of Enterobacteria	4832: 2010
Recount of viable yeasts per mL	7954:2002
Recount of fungi	7954:2002

2. *Viability of endospores.* Samples were taken at 1, 7, 30, 60, 90 and 180 days, and were cultivated on plates

2. *Viabilidad de las endosporas.* Se tomaron las muestras a los 1, 7, 30, 60, 90 y 180 días) y se sembraron

with nutrient agar. Incubation was performed at 37 °C for 24 hours under aerobic conditions. Microorganism count was made through the number of colony forming units (CFU). It was determined by visual counting of colonies on plates with nutrient agar.

3. *pH dynamics*. To determine pH dynamics at both temperatures, samples were taken at 1, 7, 30, 60, 90 and 180 days, and three repetitions were made. The measurement of the pH values was carried out in a digital pH meter (Sartorius Meter PP-25).

*Statistical processing*. For data analysis, the statistical software INFOSTAT, version 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012) was used. The analyses of variance were performed to verify differences among means, with a significance level of  $P < 0.05$ . Duncan (1955) test was applied to perform multiple comparisons among means, in the treatments viability of endospores and pH dynamics.

## Results and Discussion

*Microbiological quality of zootechnical additives*. The results from the microbiological quality study of the zootechnical additives SUBTILPROBIO® C-31, C-34 and E-44, at the two temperatures studied: room ( $24 \pm 3^\circ\text{C}$ ) and refrigeration ( $4 \pm 8^\circ\text{C}$ ) did not show the presence of contaminating microbial agents. The counts of yeasts and fungi were in the permissible ranges (yeast:  $<10^3$  mL and fungi:  $<10\text{UFC.mL}^{-1}$ ) for the consumption of biological products.

These results can be associated to the ability of *Bacillus* genus to produce a wide variety of antimicrobial substances, all of a protein nature, which differ in their mode of action and chemical structure, which are discharged outside the cells. This allows them to establish and, in this way, inhibit the presence of pathogenic microorganisms in a biological product, as well as the production of hydrogen peroxide, which is recognized as an inhibitor of the growth of Gram-negative bacteria.

This research corresponds to reports of Flores *et al.* (2015) about the zootechnical additives, that although it is true that *Lactobacillus*, yeasts or other group of microorganisms may have a probiotic potential, it is essential to evaluate their microbiological quality, durability over time and components of each product that is used.

In this sense, research carried out by Milián *et al.* (2017a) and Rodríguez (2017) reported that one of the advantages of *Bacillus* genus is the ability to produce LFB 112-type bacteriocin and the lipopeptides Surfactin and Mycosubtilin. They inhibit the development of Gram-positive and Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, *Salmonella spp.*, *C. perfringens*, *Streptococcus spp.*, *S. aureus*, *Pasteurella multocida*, and *P. aeruginosa*. The results are in line with the aforementioned, since the presence of these pathogens was not observed in the zootechnical additives SUBTILPROBIO® C-31, C-34

en placas con agar nutriente. La incubación se realizó a 37 °C durante 24 horas en condiciones de aerobiosis. El conteo de microorganismos se realizó a través del número de unidades formadoras de colonias (UFC). Se determinó por conteo visual de colonias en placas con agar nutriente.

3. *Dinámica del pH*. Para determinar la dinámica del pH en ambas temperaturas, se tomaron muestras a los 1, 7, 30, 60, 90 y 180 días, y se efectuaron tres repeticiones. La medición de los valores de pH se realizó en un pHmetro digital (Sartorius Meter PP-25).

*Procesamiento estadístico*. Para el análisis de los datos se utilizó el software estadístico INFOSTAT, versión 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012). 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, en los tratamientos viabilidad de las endosporas y dinámica de pH.

## Resultados y Discusión

*Calidad microbiológica de los aditivos zootécnicos*. Los resultados del estudio de calidad microbiológica de los aditivos zootécnicos SUBTILPROBIO® C-31, C-34 y E-44, en las dos temperaturas estudiadas: ambiente ( $24 \pm 3^\circ\text{C}$ ) y refrigeración ( $4 \pm 8^\circ\text{C}$ ) no arrojaron la presencia de agentes microbianos contaminantes. Los recuentos de levaduras y hongos estuvieron en los rangos permisibles (levaduras:  $<10^3$  mL y hongos:  $<10\text{UFC.mL}^{-1}$ ) para el consumo de productos biológicos.

Estos resultados se pueden asociar a la capacidad que tiene el género *Bacillus* de producir una amplia variedad de sustancias antimicrobianas, todas de naturaleza proteica, que difieren en su modo de acción y estructura química, las que se vierten hacia el exterior de las células, lo que permite establecerse y de esta forma inhibir la presencia de microorganismo patógenos en un producto biológico, así como, la producción de peróxido de hidrógeno, el cual se reconoce como inhibidor del crecimiento de bacterias Gram negativas.

Dicha investigación se corresponde con lo que declararon Flores *et al.* (2015) acerca de los aditivos zootécnicos, que si bien es cierto que los *Lactobacillus*, levaduras u otro grupo de microorganismos pueden tener un potencial probiótico, es imprescindible evaluar su calidad microbiológica, durabilidad en el tiempo y componentes de cada producto que se emplee.

En tal sentido, investigaciones realizadas por Milián *et al.* (2017a) y Rodríguez (2017) informaron que una de las ventajas del género *Bacillus* es la capacidad de producir bacteriocina de tipo LFB 112 y los lipopéptidos Surfactin y Mycosubtilin los cuales inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas y Gram negativas, tales como *E. coli*, *Salmonella spp.*, *C. perfringens*, *Streptococcus spp.*, *S. aureus*, *Pasteurella multocida*, y *P. aeruginosa*. Los resultados se encuentran en línea con lo antes referido, ya que no se observó la presencia de ninguno de estos patógenos en los aditivos zootécnicos SUBTILPROBIO®

and E-44, so it can be deduced that the bacteriocins produced by *B. subtilis* had their effect.

Results homologous to those derivatives in this study, were those reported by Molero *et al.* (2017), when evaluating the microbiological quality and useful life of fermented probiotic beverages based on whey, obtaining a high level of innocuity, thanks to a low recount of mesophilic aerobes and absence of total and fecal coliforms and *S. aureus*.

Rondón (2009) and Pérez *et al.* (2016) performed similar studies in zootechnical additives PROBIOLACTIL® and PROBIOLEV®, where they obtained similar results to this research. The recount of fecal and total coliforms, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus cereus*, in all cases was negative, fungi ( $<10$  CFU / mL<sup>-1</sup>), yeasts ( $<10^3$ /mL) and *Salmonella spp.* (no presence).

Yeast levels obtained for the three additives are in the permissible range ( $<10^3$ mL), it is inferred that their inhibitory action had an effect on the quality of the additives as an antibacterial agent. Yeasts contain mannan oligosaccharides f (MOS) in their cell walls. These limit the adherence of lectinases to carbohydrates and reduce the colonization of pathogens such as *E. coli* and *Salmonella spp.* Many authors refer to the action of yeasts as inhibitors of pathogenic microorganisms (Alcázar *et al.* 2016 and Rodríguez 2017).

*Viability of endospores.* Viability of endospores in the zootechnical additives SUBTILPROBIO® C-31, C-34 and E-44, add no significant differences in the endospore counting (16 Log UFC.mL<sup>-1</sup>) at room temperatures ( $25 \pm 3$  °C) and refrigeration ( $4 \pm 8$  °C). This is explained by the ability of bacterial endospores to survive under extreme conditions. Reports by Espitia *et al.* (2014) demonstrate this, when they defined that spores of *Bacillus* contain a large amount of small proteins that resist sudden temperature changes, act against acids, formaldehydes and conservation techniques among others.

Caicedo and Chacón (2017) refer that strains of *B. subtilis* possess a quorum sensing mechanism that consists of the perception of cell density. It means that it allows the bacteria to act in a coordinated manner, giving the characteristic of survival by helping them to maintain itself in nature, since it responds to environmental conditions due to nutrient availability. This mechanism is due to peptides that control the expression of genes involved in sporulation.

Other research in the field of viability of endospores are reported by Raisman and González (2013), who refer that strains of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus permians* under certain conditions, the viability of spores is so prolonged, that it is possible to consider that they can survive indefinitely.

The existence of many methods to conserve viability of biological products is reported worldwide.

C-31, C-34 y E-44, por lo que se puede deducir que las bacteriocinas producidas por *B. subtilis* hicieron su efecto.

Resultados homólogos a los derivados en este trabajo, fueron los reportados por Molero *et al.* (2017), al evaluar la calidad microbiológica y vida útil de bebidas probióticas fermentadas a base de lactosuero, donde obtuvieron alto nivel de inocuidad, gracias a un recuento bajo de aerobios mesófilos y ausencia de coliformes totales, fecales y *S. aureus*.

Estudios similares realizaron Rondón (2009) y Pérez *et al.* (2016) a los aditivos zootécnicos PROBIOLACTIL® y PROBIOLEV® donde obtuvieron resultados análogos a esta investigación. El recuento de coliformes fecales y totales, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Bacillus cereus*, en todos los casos fue negativo; hongos ( $<10$  UFC/mL<sup>-1</sup>), levaduras ( $<10^3$ /mL) y *Salmonella spp.* (no presencia).

Los niveles de levadura obtenidos para los tres aditivos están en el rango permisible ( $<10^3$ mL), se infiere que su acción inhibitoria tuvo un efecto en la calidad de los aditivos como agente antibacteriano. Las levaduras presentan en sus paredes celulares oligosacáridos de manano (MOS), los que limitan la adherencia de las lectinasas a los carbohidratos y reducen la colonización de patógenos como *E. coli* y *Salmonella spp.* Muchos autores refieren el accionar de las levaduras como inhibidores de microorganismo patógenos (Alcázar *et al.* 2016 and Rodríguez 2017).

*Viabilidad de las endosporas.* La viabilidad de las endosporas en los aditivos zootécnicos SUBTILPROBIO® C-31, C-34 y E-44, no arrojan diferencias significativa en cuanto al conteo de endosporas (16 Log UFC.mL<sup>-1</sup>) en las temperaturas ambiente ( $25 \pm 3$  °C) y refrigeración ( $4 \pm 8$  °C). Esto se explica por la capacidad que tienen las endosporas bacterianas de sobrevivir en condiciones extremas. Reportes de Espitia *et al.* (2014) así lo demuestran, cuando definieron que las esporas de *Bacillus* contienen una gran cantidad de proteínas pequeñas que resisten a cambios bruscos de temperaturas, accionar frente a ácidos, formaldehídos y a técnicas de conservación entre otros.

Caicedo y Chacón (2017) refieren que las cepas de *B. subtilis* posee un mecanismo de percepción de cuórum (quorum sensing) que consiste en la percepción de la densidad celular, es decir que permite a las bacterias actuar de manera coordinada, dando la característica de supervivencia ayudándolas a mantenerse en la naturaleza, ya que responde a las condiciones ambientales debido a la disponibilidad de nutrientes. Este mecanismo se debe gracias a los péptidos que son los que controlan la expresión de genes involucrados en la esporulación.

Otras investigaciones en el campo de la viabilidad de las endosporas son reportadas por Raisman y González (2013) quienes refieren que cepas de *Bacillus sphaericus* y *Bacillus permians* bajo determinadas condiciones, la viabilidad de las esporas es tan prolongada, que cabe la posibilidad de plantearse que las mismas puedan sobrevivir indefinidamente.

Se reportan mundialmente la existencia de muchos



Cryopreservation is among these methods, which is adequate and is, after the lyophilization method, the most convenient to guarantee bacteria viability over time (Bagatolli 2017).

De Araujo (2016) referenced that microencapsulation under the spray drying technique is an alternative to maintain the integrity of probiotic strains. Their studies report a 72 % and 70 % of survival of bacilli and lactobacilli, respectively.

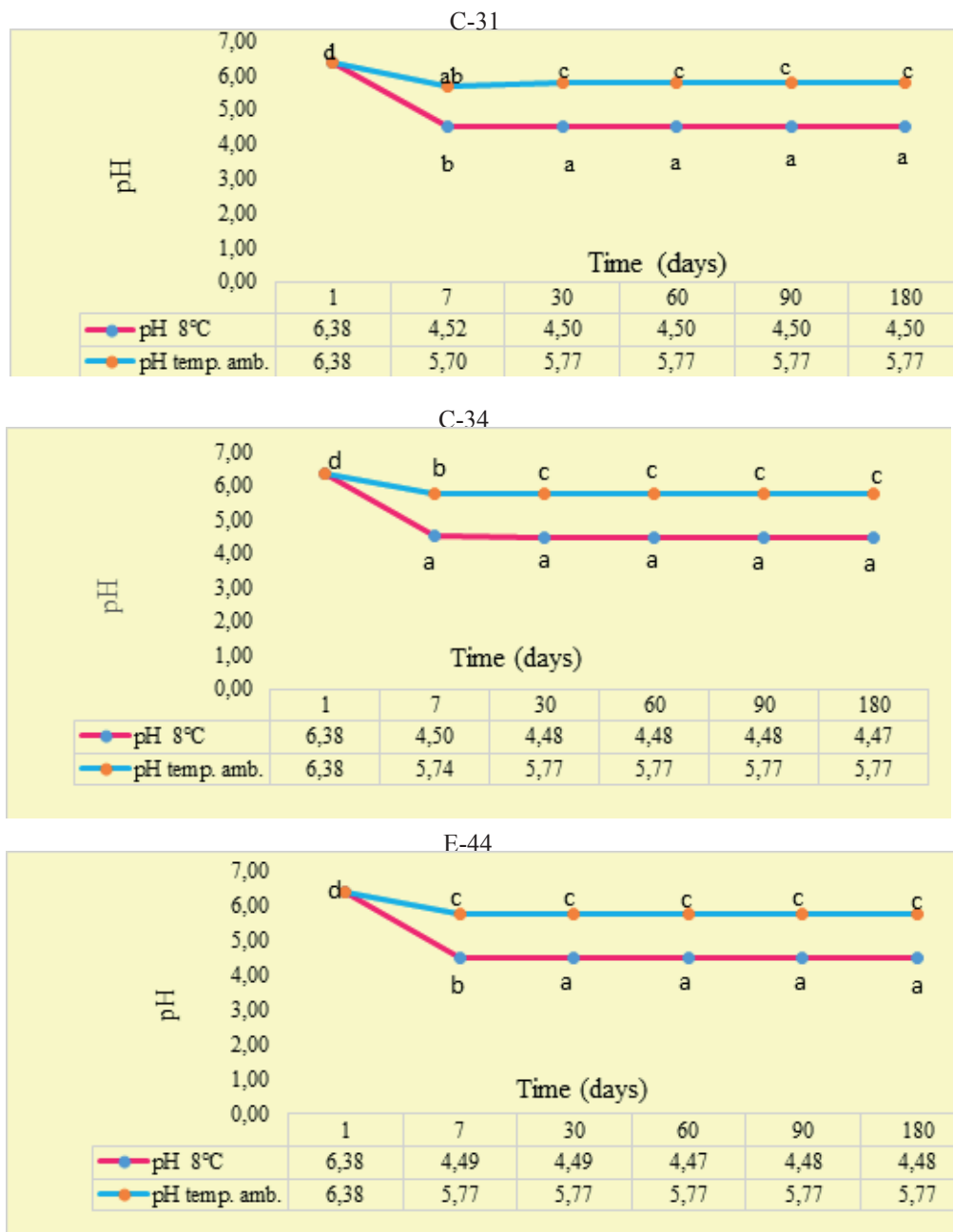
Gutiérrez (2016) defined that one of the most used technique in the industry to preserve biological products, due to its high reproducibility and economy, is spray drying. This author, when microencapsulated strains of *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus polymyxa*; *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus delbruecki* sub bulgaricus, achieved viability for 30 days of storage.

pH dynamics. The results of the pH performance are

métodos para conservar la viabilidad de los productos biológicos. Dentro de estos métodos se encuentra la criopreservación la cual resulta adecuada y es, después del método de liofilización, el más conveniente para garantizar la viabilidad de bacterias en el tiempo (Bagatolli 2017).

De Araujo (2016) referenció que la microencapsulación bajo la técnica de secado por aspersión, es una alternativa para mantener la integridad de las cepas probióticas. Sus estudios reportan 72 % y 70 % de supervivencia de bacilos y lactobacilos, respectivamente.

Gutiérrez (2016) definió que una de la técnica más utilizada en la industria para conservar productos biológicos, por su alta reproducibilidad y economía, es el secado por aspersión. Dicho autor cuando microencapsuló a cepas de *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus* y *Bacillus polymyxa*; *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus delbruecki* sub bulgaricus, logro



pH <sup>a,b,c</sup> different letters differ at P<0.05 (Duncan 1955), SE±0.01

Figure 1. Dynamics of pH of the zootechnical additive SUBTILPROBIO® C-31, C-34 and E-44 at room temperature (25 ± 3 °C) and refrigeration (4±8 °C)

shown in figure 1. For the three additives, the 7<sup>th</sup>-day pH value is observed as low with respect to its initial value at the two temperatures [room ( $25 \pm 3$  °C) and refrigeration ( $4 \pm 8$  °C)] and from there, it remains stable until the end of sampling.

The literature that deals with the subject of probiotics states that one of the characteristics of additives with cultures of *Bacillus spp.* is to favor the increase of lactobacilli. Therefore, in this result, the presence of lactic acid bacteria (LAB) could have an impact. Also the production of enzymes or some type of secondary metabolite produced by the bacillus. Nguyen (2017) and Nguyen and Nguyen (2017) stated that LAB are high producers of organic acids, which lower the pH and prevent colonization by undesirable bacteria.

Adedeji *et al.* (2011) and López *et al.* (2013) define that pH is directly related to the degradation processes that occur during conservation. In this sense, when a biological product reaches pH values between 3.8 and 4.2, its stability is achieved. This condition causes a restriction of the activity of proteolytic enzymes and the suppression of enterobacteria and Clostridium. The evaluated product is in the range 4 and 5.

Powthong and Suntornthiticharo (2015) state that the presence of LAB, in biological products, guarantees security and stability in its use as animal feed. The LAB are microorganisms that have diverse applications and one of the most important is the biopreservation and quality of sensory characteristics of food. Those facts referred by these authors are corroborated with the results obtained by Milián *et al.* (2013), when evaluating the zootechnical additives SUBTILPROBIO® C-31, C-34 and E-44 in microbiological indicators in in vivo EB24 broilers. They obtained increases in the counting of *Lactobacillus spp.* and decrease in coliforms at the level of caeca at 21, 35 and 42 days of sampling.

Research reported by Rendó *et al.* (2014) refer that, when the biological product obtained is adequate, sugars in the medium are mainly converted to lactic acid and acetic acid, responsible for the rapid fall of pH, which inhibits the growth of pathogenic microorganisms that cause great losses of biological foods for animals. The results of this research allow to correlate the previously mentioned facts, since the culture medium used for the elaboration of zootechnical additives SUBTILPROBIO® C-31, C-34 and E-44, was formulated with final molasses as carbon source, which provides glucose, fructose and sucrose (Milián *et al.* 2017b).

The results obtained throughout the research are in line with the reports of Pérez *et al.* (2011) when they evaluated the stability in time of PROBIOMEX®, product of competitive exclusion based on lactic bacteria and *Bacillus spp.*, with favorable results and similar to those obtained in this research. This mixture showed

una viabilidad por 30 días de almacenamiento.

Dinámica del pH. Los resultados del comportamiento del pH se muestran en la figura 1. Para los tres aditivos se observa como baja el valor del pH al 7 día con respecto a su valor inicial en las dos temperaturas [ambiente ( $25 \pm 3$  °C) y refrigeración ( $4 \pm 8$  °C)] y a partir de ahí se mantiene estable hasta el final del muestreo.

La literatura que aborda la temática de los probióticos expone que una de las características de los aditivos con cultivos de *Bacillus spp.* es de favorecer el incremento de los lactobacilos. Por lo que la presencia de bacterias ácido lácticas (BAL) pudiera incidir en este resultado. Además la producción de enzimas o algún tipo de metabolito secundario producido por el bacilo. Nguyen (2017) y Nguyen y Nguyen (2017) plantearon que las BAL son altas productoras de ácidos orgánicos, los cuales disminuyen el pH y previenen la colonización por bacterias indeseables.

Adedeji *et al.* (2011) y López *et al.* (2013) definen que el pH se relaciona directamente con los procesos degradativos que ocurren durante la conservación. En este sentido, cuando un producto biológico alcanza valores de pH entre 3,8 y 4,2 se logra su estabilidad. Esta condición hace que ocurra una restricción de la actividad de las enzimas proteolíticas y la supresión de enterobacterias y Clostridium. El producto evaluado está en el rango 4 y 5.

Powthong y Suntornthiticharo (2015) refieren que la presencia de las BAL en los productos biológicos garantiza la seguridad y estabilidad para su uso en la alimentación animal. Las BAL son microorganismos que tienen diversas aplicaciones y una de las más importantes lo constituye la biopreservación y la calidad de las características sensoriales de los alimentos. Lo referido por dichos autores se corrobora con los resultados obtenidos por Milián *et al.* (2013), al evaluar los aditivos zootécnicos SUBTILPROBIO® C-31, C-34 y E-44 en indicadores microbiológicos in vivo en pollos de ceba EB24, donde obtuvieron incrementos en el conteo de *Lactobacillus spp.* y disminución de los coliformes a nivel de los ciegos a los 21, 35 y 42 días de muestreo.

Investigaciones reportadas por Rendó *et al.* (2014) refieren que cuando el producto biológico obtenido es adecuado, los azúcares del medio se convierten en ácido láctico y acético principalmente, responsable de la pronta caída del pH, el cual inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos que son los causantes de grandes pérdidas de alimentos biológicos para animales. Los resultados emanados en esta investigación permiten correlacionar lo antes expuesto, ya que el medio de cultivo que se utilizó para la elaboración de los aditivos zootécnicos SUBTILPROBIO® C-31, C-34 y E-44, se formuló con: miel final como fuente de carbono, que aporta glucosa, fructosa y sacarosa (Milián *et al.* 2017b).

Los resultados obtenidos a lo largo de la investigación se encuentran en línea con los reportes de Pérez *et al.* (2011) cuando evaluaron la estabilidad en el tiempo del PROBIOMEX®, producto de exclusión competitiva a base de bacterias lácticas y *Bacillus spp.*, con

a high growth capacity and stability during storage for a period of 30 days under the same conditions of refrigeration and environment.

Similar results were obtained by García *et al.* (2013), when they evaluated the zootechnical additive PROBICID and demonstrated that it can be used and stored at 30°C for up to 6 months.

The results of this research show the real possibility of the zootechnical additives SUBTILPROBIO® C-31, C-34 and E-44 for their conservation in both temperatures up to 180 days, since there have no biological or chemical negative effects that interfere in their quality.

resultados favorables y similares con los obtenidos en esta investigación. Esta mezcla demostró una elevada capacidad de crecimiento y estabilidad durante el almacenaje por un periodo de 30 días en las mismas condiciones de refrigeración y ambiente.

Fueron similares los resultados obtenidos por García *et al.* (2013), cuando evaluaron el aditivo zootécnico PROBICID y demostraron que se puede utilizar y almacenar a 30 °C hasta 6 meses.

Los resultados de esta investigación arrojan la posibilidad real que tienen los aditivos zootécnicos SUBTILPROBIO® C-31, C-34 y E-44 para su conservación en ambas temperaturas hasta los 180 días, ya que no se producen afectaciones biológicas o químicas que interfieran en su calidad.

## References

- Adedeji, L.O., Olapade- Ogunwole, F., Farayola, C. O. & Adejumo, I.O. 2011. Productivity effects of occupational hazards among poultry farmers and farm workers in Osogbo Local Government area of Osumn State. *Inter. J. Of .Poult. Sci.* 10 (11), 876-870.
- Alcázar, V., Elba, M., Arrizon, G., Javier, P., Gschaedler, M., Anne, C., Lugo, C. & Eugenia, C. 2016. Extracción y cuantificación de los polisacáridos de la pared celular de las levaduras, *egnosis*. 14:1-7. Universidad de Guadalajara Guadalajara, México. Available: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73048315002>> [Consulted: February 12, 2019].
- Arteaga, F., Laurencio, M., Rondón, A., Milián, G. & Boucourt, R. 2018. Isolation, selection and identification of *Lactobacillus spp.* with probiotic and technological potential, from digestive tract of backyard chickens. *Revista de la Sociedad Venezolana De Microbiología*. 38(1): 15-20. ISSN: 1315-2556.
- Bagatoli, G. C. D. 2017. Validación de un método alternativo para la conservación de bacterias. Tesis de grado de Licenciatura en Bromatología. Universidad Nacional Cuyo, Argentina. Available: <http://www.fca.uncu.edu.ar/> [Consulted: March 11, 2019].
- Bennett, R.W. & Lancette, G. A. 2007. Food and Drug Administration (FDA). *Bacteriological Analytical Manual*. On-line <http://www.fda.gov/oc/sapnish/>.
- Caicedo, M. S. E y Chacón M. J. A. 2017. Pruebas bajo invernadero de cepas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de *Alternaria spp.* en Brassica oleracea varitalica. Técnicas de Conservación de cepas. Thesis in Ingeniera en biotecnología de los recursos naturales. Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador. p. 89. Available: < <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13545/1/UPS-QT1134>> [Consulted: March 11, 2019].
- Caicedo, W & Valle, S. 2017. Alimento funcional: capítulo 8: Fermentación de tubérculos de taro (*Colocasia esculenta* (L) Scott). Un alimento funcional para porcinos en la región Amazónica. Editorial Académica Española. ISBN: 978-3-639-53478-8; p. 184-200.
- De Araujo, N. U. 2016. Viabilidad de los Probióticos *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* microencapsulados bajo la técnica de secado por aspersión. Master Thesis. Universidad Nacional de Colombia. p. 43. Available: <http://bdigital.unal.edu.co/56414/1/32244578>.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Duncan, B. 1955. Multiple ranges and multiple F. Test *Biometrics* 11(1):1-42. ISSN:0006-341X, DOI:10-2307/3001478.
- Espitia, L. C. H., Sánchez, S. J. L. & Bandala. E. R. 2014. Métodos para la inactivación de esporas en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniera de los Alimentos*. 8 (1): 48-67.
- Flores, M. L. G., García, H. Y., Proaño, O. F. B. & Caicedo, Q. W. O. 2015. Evaluación de tres dosis de un preparado microbiano, obtenido en Ecuador, en la respuesta productiva y sanitaria de cerdos en posdestete. *Rev. Cien. Agri.* 12(2):59-70. DOI: <http://dx.doi.org/10.19053/01228420.4392>.
- García, G. B., Brizuela-Herrada, M. A., Delgado-Arrieta, G., Serrano-Méndez, P. & Pérez-Leonard, H. 2013. Predicción de la estabilidad del probiótico PROBICID de *Lactobacillus plantarum* B-103-1-5 por el método de máxima probabilidad. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 47 (2): 35-41. ISSN: 0138-6204. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223128548006>.
- Gutiérrez, L. A.R. 2016. Caracterización de cepas de *Bacillus sp* y Bacterias ácido lácticas con actividad probiótica en el tracto digestivo de Tilapia roja (*Oreochromis sp*) como potencial consorcio para procesos de microencapsulación. Ph.D. Thesis, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medellín, Colombia, 105 p
- López, M.P.C., Zolim, J.F.A., Alberton, L.R., Otutumi, L.K., Silveira, A.P. Mesa, S.K.L. 2013. Caracterización nutricional da silagem de bagaco de cana açúcar (*Saccharum officinarum* L.) adicionada ou nao de soro de queijo e/ou grao de milho. *Arq. Cienc. Vet. Zool* 16(1): 41-46.
- Milián, G., Rondón, A.J., Pérez, M., Arteaga, F., Portilla, Y., Rodríguez, M., Pérez, Y., Beruvides, A. & Laurencio, M. 2017a. Characterization of *Bacillus subtilis* strains as candidates for the preparation of animal additives. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 51 (2):209-216, ISSN: 2079-3480.

- Milián, G., Rondón, A. J., Pérez, M., Arteaga, F., Portilla, Y., Rodríguez, M., Pérez, Y., Beruvides, A. & M. Laurencio. 2017b. Methodology for the isolation, identification and selection of *Bacillus*. Cuban Journal of Agricultural Science. 51 (2):197-207, ISSN: 2079-3480.
- Milián, G., Rondón, A. J., Pérez, M., Boucourt, R., Rodríguez, Z., Ranilla, M. J. Rodríguez, M. & Carro, M.D. 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., Boucourt, R., Ranilla, M.J., 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.
- Molero, M. M., Aiello, C. M., Araujo, M. J. & Briñez, Z. W. 2017. Calidad físico-química, microbiológica y vida útil de bebidas probióticas fermentadas a base de lactosuero. Revista Científica, 27 (5):1-12 ISSN: 0798-2259.
- Molina, R. M. M. 2016. Desarrollo de leche de soya en polvo con un ingrediente funcional por medio de la microencapsulación de cultivos probióticos (*Lactobacillus casei* 01) utilizando el método de secado por aspersión. Thesis Ing. Químico. Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador. 143p.
- Montañez, L. & Castro, C. H. 2006. Resistencia de las endosporas de *Bacillus subtilis* en ambientes terrestres y extraterrestres extremos [www.uprh.edu/salterns/geomicrobiolgy/resistencia%20de%20las%20Endosporas](http://www.uprh.edu/salterns/geomicrobiolgy/resistencia%20de%20las%20Endosporas).
- NC ISO 4832:2010. Microbiología de los Alimentos de Consumo Humano y Animal. Método horizontal para la enumeración de Coliformes. Método de referencia.
- NC ISO 4833<sup>-1</sup>:2014. Microbiología de la cadena alimentaria- Método horizontal para la enumeración de microorganismos- Parte 1: Conteo de colonias a 30°C por la Técnica de placa vertida.
- NC ISO 6579:2008. Microbiología de los Alimentos de Consumo Humano y Animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella spp.*
- NC ISO 6888<sup>-1</sup>:2003. Enumeración de *Staphylococcus coagulans* positiva. Parte 1. Técnica utilizando el medio Agar Baird Parker.
- NC ISO 7954:2002. Microbiología de Alimentos de Consumo Humano y Animal. Método para el conteo de levaduras. Vig. Mayo 2003.
- Nguyen, T.T. 2017. Effects of  $\beta$ -glucan, organic acids and probiotic in the diet on growth performance and health status of weanling pigs. 29 (6):1-8. Available: <file:///F:/nthi29124.html>.
- Nguyen, T.T. & Nguyen, C. H. 2017. Effects of inclusion of protein hydrolysis from tra catfish by-product waste water in the diets on apparent ileal digestibility and total tract retention coefficients of local chickens. Livestock Research for Rural Development, 29 (3), 55<[www.cipav.org.co/lrd/lrd19/9thuy19124.htm](http://www.cipav.org.co/lrd/lrd19/9thuy19124.htm)>.
- Pérez, M., Laurencio, M., Rondón, A., Milián, G., Boucourt, R. & Arteaga, F. 2011. Actividad antimicrobiana de una mezcla probiótica de exclusión competitiva y su estabilidad en el tiempo. Rev. Salud Anim. 33(3): 147-153. [scielo.sld.cu/pdf/fyf/v40n1/pyf01117](http://scielo.sld.cu/pdf/fyf/v40n1/pyf01117).
- Pérez, M. P., Milián, G. F., Boucourt, R. S. & Reynaldo, A. P. 2016. *In vitro* evaluation of pebiotics in hydrolysates of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) prepared by different methods. Revista La Técnica. 16: 64-75. ISSN: 1390-6895, ISSN: 2477-8982.
- Pérez, M. P. & Sablón, N. 2017. Alimento funcional. Editorial Académica Española. ISBN: 978-3-639-53478-8.
- Powthong, P. & Suntornthiticharo, P. 2015. Isolation, Identification and Analysis of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria from Selective Various Traditional Thai Fermented Food and Kefir. Pakistan Journal of Nutrition, 14 (2), 67-74
- Raisman, J. & Gonzáles, M. A. 2013. Endosporas y formas de persistencia. Hipertextos en el Área de la Biología. Available: <http://www.biologia.edu.ar> [Consulted: March 26, 2019].
- Rendón, M. E., Noguera, R. R. & Posada, S. L. 2014. Vinaza de caña como aditivo acidificante en la elaboración de ensilaje de maíz (*Zea mays*). Livestock Research for Rural Development, 26 (1), ISSN: 0121-3784, Available: <<http://Irrd.cipav.org.co/Irrd26/1/rend26007.html>>.
- Rodríguez, M. 2017. Evaluación de la capacidad antibacteriana de PROBIOLEV® frente a bacterias patógenas. Ph.D. Thesis, Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba, 100 p
- Rodríguez, S., Giraldo, G. I. & Montes, L. M. 2016. Encapsulación de Alimentos Probióticos mediante Liofilización en Presencia de Prebióticos. Información Tecnológica. 27 (6): 135-144. doi: 10.4067/S0718-07642016000600014
- Rondón, A. 2009. Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación de su efecto probiótico en estos animales. Ph.D. Thesis, Instituto de Ciencia Animal, Cuba, 100 p
- Rueda, R., Nicolás, H., Gracia, M., Santana, M. E. & Horbath, J. E. 2016. Los mercados orgánicos en México como escenarios de construcción social de alternativas. Polis. 15 (43):581-605.
- Toledo, A., Castillo, N. M., Carrillo, O. & Arenal, A. 2018. Probióticos: una realidad en el cultivo de camarones. Artículo de revisión. Rev. Prod. Anim.30 (2): 57-71, ISSN: 2224-7920.
- Zhang, L., Li, J., Yun, T. T., Li, A. K., Qi, W. T., Liang, X. X., Wang, Y. W. & Liu S. 2015. Evaluation of pilot-scale microencapsulation of probiotics and product effect on broiler. American Society of Animal Science. All rights reserved. J. Anim. Sci. 93: 4796–4807, DOI: 10.2527/jas2015-9243