

Evaluation of the zootechnical additive SUBTILPROBIO® E-44 in productive and health indicators in heavy pure breeds birds under production conditions

Evaluación del aditivo zootécnico SUBTILPROBIO® E-44 en indicadores productivos y de salud en aves líneas puras pesadas en condiciones de producción

Grethel Milián¹, Marlen Rodríguez¹, O. González³, Ana J. Rondón¹, M. L. Pérez², A. Beruvides¹ and Irani Placeres¹

¹Universidad de Matanzas. Autopista Varadero km 3 ½. Matanzas, Cuba

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

³Unidad Empresarial de Base Líneas Puras Pesadas de la Empresa Genética Avícola y Pie de Cría. Matanzas
Email: grethel.milian@umcc.cu

Grethel Milián Florido: <https://orcid.org/0000-0002-4035-8643>

Marlen Rodríguez Oliva. <https://orcid.org/0000-0003-4248-3728>

Onel González Espino: <https://orcid.org/0000-0003-2934-9719>

Ana Julia Rondón Castillo: <https://orcid.org/0000-0003-3019-1971>

Manuel Lázaro Pérez Quintana: <https://orcid.org/0000-0002-9473-6507>

Agustín Beruvides Rodríguez: <https://orcid.org/0000-0002-8525-6595>

Iraní Placeres Espinosa: <https://orcid.org/0000-0002-4035-8643>

In order to evaluate the zootechnical additive SUBTILPROBIO® E-44 in productive and health indicators in E1 heavy pure breeds birds under production conditions, an experiment for a period of six weeks was developed. A completely randomized design was applied, with two treatments: control group corn-soybean basal diet and group I basal diet + SUBTILPROBIO® E-44 zootechnical additive. A total of 1800 birds with an average weight of 43 g were used, distributed in 900 birds per treatment. They were located on the floor, in similar conditions of management and feeding. To determine the probiotic effect of this zootechnical additive, live weight, conversion, uniformity, viability and mortality were evaluated. The results showed that the birds from the fourth week to the sixth expressed a probiotic response in the productive indicator live weight (4:1472g/1406), (5:1897g/1826g) and (6:2387g/2336g) for $P < 0.01$. At the end of the experiment, the productive indicators live weight (2387g/326g) and conversion showed significant values (1.8/1.9) for $P < 0.01$, as well as uniformity (88/84 %) for $P < 0.001$, with respect to the control group and to the standard for the breed under study. The mortality (3.8/8) and viability (96.2/92 %) indicators showed differences with respect to the control for $P < 0.01$. The results of the research show the feasibility of using this zootechnical additive as an improver of the productive and health indicators for this poultry category.

Key words: *probiotics, endospores of Bacillus subtilis, heavy birds*

With the triumph of the Revolution, the poultry industry in Cuba was remarkably developed. The Combinado Avícola Nacional (CAN) was created on May 22, 1964, and with it a group of production units, whose premise was to guarantee the genetic line and its main descendants, the foundation stock,

Para evaluar el aditivo zootécnico SUBTILPROBIO® E-44 en indicadores productivos y de salud en aves líneas puras pesadas E1 en condiciones de producción, se desarrolló un experimento por un período de seis semanas. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado, con dos tratamientos: grupo control dieta basal maíz-soya y grupo I dieta basal + aditivo zootécnico SUBTILPROBIO® E-44. Se emplearon 1800 aves, con peso promedio de 43 g, distribuidas en 900 aves por tratamiento. Se ubicaron en piso, en condiciones similares de manejo y alimentación. Para determinar el efecto probiótico de este aditivo zootécnico, se evaluó el peso vivo, conversión, uniformidad, viabilidad y mortalidad. Los resultados mostraron que las aves a partir de la cuarta semana y hasta la sexta expresaron una respuesta de tipo probiótica en el indicador productivo peso vivo (4:1472g/1406), (5:1897g/1826g) y (6:2387g/2336g) para $P < 0.01$. Al final del experimento, los indicadores productivos peso vivo (2387g/2326g) y conversión mostraron valores significativos (1.8/1.9) para $P < 0.01$, al igual que uniformidad (88/84.6%) para $P < 0.001$, con respecto al grupo control y al estándar para la línea en estudio. Los indicadores mortalidad (3.8/8) y viabilidad (96.2/92 %) dejaron ver diferencias con respecto al control para $P < 0.01$. Los resultados de la investigación demuestran la factibilidad del uso de este aditivo zootécnico como mejorador de los indicadores productivos y de salud para esta categoría avícola.

Palabras clave: *probióticos, endosporas de Bacillus subtilis, aves pesadas*

Con el triunfo de la Revolución, la industria avícola en Cuba se desarrolló notablemente. Se creó el Combinado Avícola Nacional (CAN) el 22 de mayo de 1964, y con él un grupo de unidades de producción, que tenían como premisa garantizar la línea genética y sus principales descendientes, los pies de crías, así

as well as the obtaining of reproducers and their hybrids for the production of egg and birds meat. This freed the country has to invest to import replacement regularly. In addition, it allowed maintaining and improving heavy pure breeds, and guaranteeing the poultry genetic basis with the existing breeds to promote the increase in meat and egg yields and their commercialization in poultry enterprises in the country (Ramírez 2014).

In order to achieve the mentioned goals, work is carried out with great productive intensity, which favors the incidence of different factors that lead to constant stress situations in animals, and this gives rise to imbalances in the intestinal microbiota, with its consequent negative impact on the health and productivity of animals (García-Hernández *et al.* 2016 and Beruvides *et al.* 2018). To mitigate these difficulties, growth-promoting antibiotics (GPA) have been used for decades. However, its prolonged and indiscriminate use caused undesirable side effects and the rejection of consumers towards animal origin products (Díaz *et al.* 2017). In this context, zootechnical additives with a probiotic effect based on *Lactobacillus spp.*, yeasts and *Bacillus spp.* spores were introduced into the feeding and management systems (Gao *et al.* 2017a and Medina-Saavedra *et al.* 2017), in order that they contribute to avoid the negative effects of the use of growth-promoting antibiotics. These additives, which have the advantages of being natural and economic products, that do not leave residues in the final products, stimulate the responses of the immune system and are enhancers of animal productivity, which allows obtaining flocks more productive, healthy and resistant to diseases (Blanch 2017 and Arteaga *et al.* 2018).

The world knows about the use of zootechnical additives. However, Cuba does not use them systematically, despite having products obtained in the country from national resources and the vast experience that the University of Matanzas (UM) and the Institute of Animal Science (ICA) have in this matter (Pérez 2000 and Rondón 2009). SUBTILPROBIO® E-44 is among the group of additives obtained by researchers from these institutions, which is the result of a simple biotechnological process, obtained under laboratory conditions. This zootechnical additive was made with endospores of *Bacillus subtilis* sub species *subtilis*, which gives it durability over time (Milián *et al.* 2014 and 2019a). It was applied in different livestock categories with favorable results in the physiological, productive and health indicators (Milián *et al.* 2017a and 2019b). Based on the potential of this product, the objective of this study was to evaluate the zootechnical additive SUBTILPROBIO® E-44 in the feeding of E1 heavy pure breeds birds in a commercial production unit, taking into account productive and health indicators.

como la obtención de reproductores y sus híbridos para la producción de huevo y carne de aves. Esto liberó al país de tener que invertir regularmente en la importación reemplazos. Además, permitió mantener y mejorar las líneas puras pesadas, y garantizar el genofondo genético de la avicultura con las razas existentes para propiciar la elevación de los rendimientos de carne y huevo, y su comercialización en las empresas avícolas del país (Ramírez 2014).

Con el objetivo de alcanzar las metas antes mencionadas, se trabaja con gran intensidad productiva, lo que favorece la incidencia de distintos factores que conducen a constantes situaciones de estrés en los animales, y ello da lugar a desequilibrios en la microbiota intestinal, con su consiguiente repercusión negativa en la salud y productividad de los animales (García-Hernández *et al.* 2016 y Beruvides *et al.* 2018). Para paliar estas dificultades, los antibióticos promotores del crecimiento (APC) se utilizaron durante décadas. Sin embargo, su uso prolongado e indiscriminado provocó efectos colaterales indeseables y el rechazo de los consumidores hacia los productos de origen animal (Díaz *et al.* 2017). En este contexto, en los sistemas de alimentación y manejo se introdujeran los aditivos zootécnicos con efecto probiótico basados en *Lactobacillus spp.*, levaduras y esporas de *Bacillus spp.* (Gao *et al.* 2017a y Medina-Saavedra *et al.* 2017), con el propósito de que contribuyeran a evitar los efectos negativos del uso de los antibióticos promotores del crecimiento. Estos aditivos, que poseen las ventajas de ser productos naturales y económicos, que no dejan residuos en los productos finales, estimulan las respuestas del sistema inmune y son mejoradores de la productividad animal, lo que permite obtener parvadas más productivas, saludables y resistentes a las enfermedades (Blanch 2017 y Arteaga *et al.* 2018).

En el mundo se conoce acerca del uso de los aditivos zootécnicos. Sin embargo, Cuba no los utiliza sistemáticamente, a pesar de contar con productos obtenidos en el país a partir de recursos nacionales y de la vasta experiencia que tienen en esta temática la Universidad de Matanzas (UM) y el Instituto de Ciencia Animal (ICA) (Pérez 2000 y Rondón 2009). En el grupo de aditivos obtenidos por los investigadores de estas instituciones se encuentra SUBTILPROBIO® E-44, que es resultado de un proceso biotecnológico sencillo, obtenido en condiciones de laboratorio. Este aditivo zootécnico se elaboró con endosporas de *Bacillus subtilis* sub especie *subtilis*, lo que le confiere durabilidad en el tiempo (Milián *et al.* 2014 y 2019a). Se aplicó en diferentes categorías pecuarias con resultados favorables en los indicadores fisiológicos, productivos y de salud (Milián *et al.* 2017a y 2019b). A partir de las potencialidades de este producto, el objetivo de este estudio fue evaluar el aditivo zootécnico SUBTILPROBIO® E-44 en la alimentación de aves líneas puras pesadas E1 en una unidad de producción comercial, teniendo en cuenta indicadores productivos y de salud.

Materials and Methods**Materiales y Métodos**

Treatments and experimental conditions. The study was carried out at Unidad de Genética Avícola y Pie de Cría, Matanzas, in the E1 heavy pure breeds category. The evaluation was carried out in May and June during the first six weeks of life of birds. During this period, the mean temperature was $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$; the maximum of $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, and the minimum of $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$. The average relative humidity was $78\% \pm 3$. The experiment was carried out according to a completely randomized design, with two treatments: control group (CG): basal diet (corn-soybean) and group I (G-I): basal diet + SUBTILPROBIO[®] E-44 zootechnical additive. A total of 1800 one-day-old birds were used, with an average weight of 43 g. A total of 900 birds were distributed per treatment.

Elaboration of the zootechnical additive SUBTILPROBIO[®]. From the *Bacillus subtilis* strain sub species subtilis C-31 (Milián *et al.* 2014), 30L of the product were made, according to the methodology proposed by Milián *et al.* (2017b).

Diet. The composition of the supplied diet is shown in table 1. The food was offered twice a day in the form of corn-soybean meal. The zootechnical additive was supplied in the G-I ration (basal diet + SUBTILPROBIO[®] E-44 zootechnical additive). It was offered every day and the additive was manually mixed with the diet. The dose that was used was 10^9 cfu.g^{-1} concentrate.

Animal management. The buildings were subjected to a health rating before the birds arrived at them. The animals were distributed by treatment for a total of 900 birds, distributed in three paddocks (300 each). The paddock dimensions were 6 m long x 7 m wide

Tratamientos y condiciones experimentales. El trabajo se desarrolló en la Unidad de Genética Avícola y Pie de Cría, Matanzas, en la categoría líneas puras pesadas E1. La evaluación se realizó en mayo y junio durante las seis primeras semanas de vida de las aves. Durante este período, la temperatura media fue de $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$; la máxima de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, y la mínima de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$. La humedad relativa promedio fue de $78\% \pm 3$. El experimento se realizó según diseño completamente aleatorizado, con dos tratamientos: grupo control (GC): dieta basal (maíz-soya) y grupo I (G-I): dieta basal + aditivo zootécnico SUBTILPROBIO[®] E-44. Se emplearon 1800 aves de un día de nacidas, con peso promedio de 43 g. Se distribuyeron 900 aves por tratamiento.

Elaboración del aditivo zootécnico SUBTILPROBIO[®]. A partir de la cepa de *Bacillus subtilis* sub especie subtilis C-31 (Milián *et al.* 2014), se elaboraron 30L del producto, según la metodología propuesta por Milián *et al.* (2017b).

Dieta. La composición de la dieta suministrada se muestra en la tabla 1. El alimento se ofreció dos veces al día en forma de harina basada en maíz-soya. El aditivo zootécnico se suministró en la ración de G-I (dieta basal + aditivo zootécnico SUBTILPROBIO[®] E-44). Se ofreció todos los días y el aditivo se mezcló manualmente con la dieta. La dosis que se empleó fue de 10^9 ufc.g^{-1} de concentrado.

Manejo de los animales. Las naves se sometieron a una habilitación sanitaria antes de que las aves arribaran a ellas. Los animales se distribuyeron por tratamiento para un total de 900 aves, distribuidas en tres cuartos (300 cada uno). Las dimensiones de los cuartos fueron

Table 1. Basal diet composition

Raw matter, %	Starting (0- 14 d)	Growing (15- 28 d)	Finishing (29-42 d)
Corn meal	42.43	54.32	60.27
Soybean meal	43.88	33.68	28.58
Sunflower oil	8.80	7.28	6.52
Dicalcium phosphate	2.57	2.45	2.39
Calcium carbonate	0.74	0.72	0.71
Common salt	0.25	0.25	0.25
DL- methionine	0.33	0.30	0.29
Vitamin –mineral pre-mixture*	1.00	1.00	1.00
Calculated analysis			
Metabolizable energy (MJ/ kg)	13.38	13.38	13.38
Crude protein (%)	23.00	20.00	18.80
Calcium (%)	0.95	0.95	0.95
Asimilable phosphorus (%)	0.42	0.42	0.42
Methionine + cystine (%)	0.92	0.87	0.82

*1 kg of food contains vitamins: A (10000 UI), D₃ (2000 UI), E (10 mg), K₃ (2 mg), Thiamine (1 mg) - B₁, Riboflavin (5 mg) - B₂, Pyridoxine (2 mg) - B₆, B₁₂ (15.4 mg), nicotinic acid (125 mg) calcium pantothenate (10 mg), folic acid (0.25 mg) and biotin (0.02 mg), as well as minerals: selenium (0.1 mg), iron (40 mg), copper (12 mg), zinc (120 mg), magnesium (100 mg), iodine (2.5 mg) and cobalt (0.75 mg).

(42m²). The rearing was on the floor and the water was ad libitum.

Experimental procedure for sample analysis. To determine the probiotic effect of the in vivo zootechnical additive, all the birds under study were selected. The average live weight of birds was determined weekly for each treatment. For this, 10 % of the mass was taken, and never less than 50 birds. They were weighed in early hours. All the weights of each sampled bird were added and divided by the number of birds to obtain the average weight. The food intake and the weight conversion per kilogram of intake food were determined. The percentage of uniformity and viability was also calculated, as well as the mortality during the six weeks that the experiment lasted, according to the technical instructions for the category.

Statistical processing. For data analysis, the statistical program INFOSTAT, version 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012) was used. A total of 900 birds per treatment were selected. Each bird constituted an experimental unit. The results were compared with the standards for the breed under study. For means comparison, the LSD Fisher (1935) test was used. For the original variables mortality and viability, the theoretical assumptions of the analysis of variance were verified. For the normality of errors, the Shapiro and Wilk (1965) test was applied and for the homogeneity of variance was proceeded with Levene (1960). Both fulfill the assumptions, so a completely randomized design was used.

Results and Discussion

Table 2 shows the live weight results of the birds studied during the first six weeks of life with respect to the standards established for this production line. In both treatments, there were not differences in the first three weeks of rearing. However, from week 4, an improvement of this indicator is seen in the group that intake the zootechnical additive SUBTILPROBIO® E-44 (P < 0.01) with respect to the control and the standards described for this rearing. This result can be associated with the characteristics of the microbial genus (*Bacillus*), among which it is a transit microorganism. Thus the need to offer it daily to achieve required levels, which allow demonstrating its probiotic effect on the animals that intake it.

Diverse are the researches that show the positive response of the inclusion of zootechnical additives with probiotic effect in the food. These provide a state of eubiosis, and improve the physiological effect on the body, beyond its nutritional value, which is reflected in the birds in productive and health indicators (Sosa *et al.* 2018). Studies obtained by Wang *et al.* (2016) show this, when they included endospores of *Bacillus subtilis* in broilers feeding. These authors verified that with this inclusion, growth is stimulated and the adequate weight

6 m de largo x 7 m ancho (42m²). La crianza se desarrolló en piso y el agua se suministró ad libitum.

Procedimiento experimental para el análisis de las muestras. Para determinar el efecto probiótico del aditivo zootécnico in vivo se seleccionaron todas las aves en estudio. Se determinó semanalmente el peso vivo promedio de las aves por cada tratamiento. Para ello se tomó 10 % de la masa, y nunca menos de 50 aves. Se pesaron en horas tempranas. Se sumaron todos los pesos de cada ave muestreada y se dividieron entre la cantidad de las aves para obtener el peso promedio. Se determinó el consumo de alimento y la conversión en peso por kilogramo de alimento consumido. También se calculó el porcentaje de uniformidad y viabilidad, así como la mortalidad durante las seis semanas que duró el experimento, según el instructivo técnico para la categoría.

Procesamiento estadístico. Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico INFOSTAT, versión 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012). Se seleccionaron 900 aves por tratamiento. Cada ave constituyó una unidad experimental. Los resultados se compararon con los estándares para la línea en estudio. Para la comparación de medias se empleó la dócima LSD de Fisher (1935). Para las variables originales mortalidad y viabilidad se verificaron los supuestos teóricos del análisis de varianza. Para la normalidad de los errores se aplicó la dócima de Shapiro y Wilk (1965) y para la homogeneidad de varianza se procedió con Levene (1960). Ambas cumplieron los supuestos, por lo que se utilizó un diseño completamente aleatorizado.

Resultados y Discusión

En la tabla 2 se presentan los resultados del peso vivo de las aves estudiadas durante las primeras seis semanas de vida con respecto a los estándares establecidos para esta línea de producción. En ambos tratamientos no se observaron diferencias en las tres primeras semanas de crianza. Sin embargo, a partir de la semana 4, se deja ver una mejora de este indicador en el grupo que consumió el aditivo zootécnico SUBTILPROBIO® E-44 (P < 0.01) con respecto al control y a los estándares descritos para esta crianza. Este resultado se puede asociar a las características propias del género microbiano (*Bacillus*), entre las que se distingue el ser un microorganismo de tránsito. De ahí la necesidad de ofrecerlo diariamente para lograr niveles requeridos, que permitan demostrar su efecto probiótico en los animales que lo consumen.

Diversas son las investigaciones que demuestran la respuesta positiva de la inclusión de aditivos zootécnicos con efecto probiótico en el alimento. Estos proporcionan un estado de eubiosis, y mejora el efecto fisiológico en el organismo, más allá de su valor nutritivo, lo que se refleja en las aves en indicadores productivos y de salud (Sosa *et al.* 2018). Estudios obtenidos por Wang *et al.* (2016) así lo demuestran, cuando incluyeron endosporas de *Bacillus subtilis* en la alimentación de pollos de engorde. Estos autores comprobaron que con dicha inclusión se

Table 2. Performance of the live weight indicator with respect to the standard with the addition of the zootechnical additive SUBTILPROBIO[®] E-44 for six weeks

Weeks	Treatments	Live weight, g	SE ± Sign
1	Breed standard	185	-
	G-I: SUBTILPROBIO [®] E-44 zootechnical additive	186	0.15 P=0.0096
	CG: control	193	
2	Breed standard	400	-
	G-I: SUBTILPROBIO [®] E-44 zootechnical additive	443	0.70 P=.0042
	CG: control	448	
3	Breed standard	820	-
	G-I: SUBTILPROBIO [®] E-44 zootechnical additive	926	0.17 P=0.0051
	CG: control	894	
4	Breed standard	1300	-
	G-I: SUBTILPROBIO [®] E-44 zootechnical additive	1472	0.14 P=0.0026
	CG: control	1406	
5	Breed standard	1820	-
	G-I: SUBTILPROBIO [®] E-44 zootechnical additive	1897	0.21 P=0.00036
	CG: control	1823	
6	Breed standard	2340	-
	G-I: SUBTILPROBIO [®] E-44 zootechnical additive	2387	0.26 P=0.0010
	CG: control	2336	

The means between the rows differ to P < 0.05 (LSD Fisher)

is reached in the animals before time.

According to Barros (2018) and Mozombite (2018), probiotics can replace antibiotic therapies and provide a new, less aggressive alternative; in addition, they allow reducing the economic losses that originate from the presence of pathogens in poultry farms. The cited authors evaluated a probiotic at two concentrations and obtained differences between the group that received the probiotic with respect to the control, for the indicator live weight, conversion and mortality, results that are similar to those obtained in this research.

Núñez *et al.* (2017), when they assessed the effect of the commercial product Enterogermina (*Bacillus clausii* spores) on the productive performance of male broilers from the Cobb Line, supplied in the drinking water, obtained an increase in the weight of treated birds with respect to those of the control. This agrees with the results obtained in this study with the use of *Bacillus subtilis* spores, which allows us to infer that the use of this probiotic is a viable alternative in Cuban poultry farming.

Rodríguez *et al.* (2015), when evaluating a probiotic mixture of two zootechnical additives (PROBIOLACTIL[®] C65 and SUBTILPROBIO[®] E-44) with respect to the standard in Heavy Pure Breeds B4 birds for five weeks, obtained positive results in terms of weight increase from the third week of inclusion of the biopreparations (793, 1249 and 1587g). This result is reaffirmed in the Rendón *et al.* (2015) and Valdés (2018) reports, when they refer to the use of mixtures of microorganisms in biopreparations for

estimula el crecimiento y se alcanza el peso adecuado en los animales antes de tiempo.

Según Barros (2018) y Mozombite (2018), los probióticos pueden sustituir las terapias con antibióticos y brindar una nueva alternativa menos agresiva; además de que permiten disminuir las pérdidas económicas que se originan por la presencia de patógenos en las explotaciones aviares. Los autores citados evaluaron un probiótico a dos concentraciones y obtuvieron diferencias entre el grupo que recibió el probiótico con respecto al control, para el indicador peso vivo, conversión y mortalidad, resultados que son semejantes a los obtenidos en esta investigación.

Núñez *et al.* (2017), cuando valoraron el efecto del producto comercial Enterogermina (esporas de *Bacillus clausii*) en el comportamiento productivo de pollos de engorde machos de la Línea Cobb, suministrado en el agua de bebidas, obtuvieron incremento en el peso de las aves tratadas con respecto a las del control. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio con la utilización de esporas de *Bacillus subtilis*, lo que permite inferir que el uso de este probiótico es una alternativa viable en la avicultura cubana.

Rodríguez *et al.* (2015), al evaluar una mezcla probiótica de dos aditivos zootécnicos (PROBIOLACTIL[®] C65 y SUBTILPROBIO[®] E-44) con respecto al estándar en aves de Línea Pura Pesada B4 durante cinco semanas, obtuvieron resultados positivos en cuanto al incremento de peso desde la tercera semana de inclusión de los biopreparados (793, 1249 y 1587g). Este resultado se reafirma en los informes de Rendón *et al.* (2015) y Valdés (2018), cuando refieren la utilización de mezclas de microorganismos en

animal production.

The obtained results allow inferring that the effect of probiotics on poultry farming resides, regardless of the experimental designs that are used, on the positive action they exert on the productive response of the animals that intake them.

Table 3 shows the results achieved in the productive indicators, when the first six weeks of life of the birds under study ended. There was difference ($P < 0.01$) for live weight and conversion. However, for the intake indicator, there were not differences between the GI and the control group. The uniformity indicator showed differences ($P < 0.001$) in the group treated with the nutritional additive SUBTILPROBIO® E-44 with respect to the control.

biopreparados destinados a la producción animal.

Los resultados obtenidos permiten inferir que el efecto de los probióticos en la avicultura reside, independientemente de los diseños experimentales que se utilicen, en la acción positiva que ejercen en la respuesta productiva de los animales que los consumen.

En la tabla 3 se muestran los resultados logrados en los indicadores productivos, cuando culminaron la seis primeras semanas de vida de las aves en estudio. Se observó diferencia ($P < 0.01$) para el peso vivo y la conversión. Sin embargo, para el indicador consumo no se expresaron diferencias entre el GI y el grupo control. El indicador uniformidad reflejó diferencias ($P < 0.001$) en el grupo tratado con el aditivo nutricional SUBTILPROBIO® E-44 con respecto al control.

Table 3. Performance of the productive indicators up to the sixth week of the rearing cycle of heavy pure breeds E1 birds, fed ad libitum with SUBTILPROBIO® E-44

Indicators	Treatments			SE ± Sign
	Breed standard	GI: SUBTILPROBIO® E-44	CG: Control	
Live weight, g	2340.00	2387.00	2336.00	0.89 P=0.0016
Intake, g	4.97	4.51	4.60	0.12
Conversion	2.12	1.88	1.96	0.15 P=0.0025
Uniformity, %	80.0	88.0	84.6	0.11 P<0.0001

The means between the rows differ to $P < 0.05$ (Duncan 1955)

Respect to the use of probiotics in poultry farming, there are infinite studies that report and show the effectiveness of biopreparations based on *Bacillus spp.* endospores. The results obtained in this research, as well as the reports available in the literature, together with Gao *et al.* (2017b) results show this. These authors, when using a *B. subtilis* strain as a probiotic microorganism, observed an improvement in the conversion and increased growth of the treated animals, with respect to the control group.

Other studies, such as that of Ortiz *et al.* (2013), show results similar to those of this research, when they added the probiotic ECOBIOL (*Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940) to the diet of 480 broilers (Arbor Acres Plus), and obtained better yield when reaching the final weight (2 575 g) in 2.5 d less than in the control group. These authors stated that probiotics can improve conversion (1.98 vs. 2.06) and the efficiency index (259 vs. 242), as well as decrease mortality (6.28 vs. 6.77 %).

Bai *et al.* (2016) reported improvements in weight gain and feed conversion rate in one-day-old Arbor Acres males, when they supplemented basal diets with *Bacillus subtilis* mbJ (BSfmbJ) at doses of 2, 3 and 4 x 10¹⁰ cfu/kg, without using antibiotics. The reports by Zhang *et al.* (2013) refer the benefits of including *B. subtilis* in the diets, by achieving better weight gain and feed conversion with the use of the probiotic, which exceeded the results obtained with the diets in which an antibiotic was added. Nuñez *et al.*

Sin lugar a duda, en la temática del uso de probióticos en la avicultura son infinitos los estudios que informan y demuestran la efectividad de los biopreparados basados en endosporas de *Bacillus spp.* Los resultados obtenidos en esta investigación, así como los informes disponibles en la literatura, conjuntamente con los resultados de Gao *et al.* (2017b) así lo demuestran. Estos autores, cuando emplearon una cepa de *B. subtilis* como microorganismo probiótico, observaron mejora en la conversión y el incremento del crecimiento de los animales tratados, con respecto al grupo control.

Otros estudios, como el de Ortiz *et al.* (2013), muestran resultados afines a los de esta investigación, cuando adicionaron el probiótico ECOBIOL (*Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940) a la dieta de 480 pollos de engorde (Arbor Acres Plus), y obtuvieron mejor rendimiento al lograr el peso final (2 575 g) en 2.5 d menos que en el grupo control. Estos autores plantearon que los probióticos pueden mejorar la conversión (1.98 vs. 2.06) y el índice de eficiencia (259 vs. 242), así como disminuir la mortalidad (6.28 vs. 6.77 %).

Bai *et al.* (2016) informaron mejoras en el aumento de peso y la tasa de conversión alimentaria en machos Arbor Acres de un día de nacidos, cuando suplementaron dietas basales con *Bacillus subtilis* mbJ (BSfmbJ) en dosis de 2, 3 y 4 x 10¹⁰ ufc/kg, sin usar antibióticos. Los informes de Zhang *et al.* (2013) refieren los beneficios de incluir *B. subtilis* en las dietas, al lograr mejor ganancia de peso y conversión alimentaria con el uso del probiótico, que superó los resultados obtenidos con

(2017), when evaluating the productive performance of broilers supplemented with Eterogermina® in drinking water, recorded differences for the weight and conversion indicators, and not for intake, which coincides with what was obtained in this study. These results, which support those of this study, confirm the importance of zootechnical additives with a probiotic-type effect on birds. Specifically, SUBTILPROBIO® E-44 showed that the treated animals made more efficient use of the nutrients provided by the intake food, when obtaining a higher live weight with a similar food intake.

Table 4 shows the results obtained in the mortality and viability indicators. For both there is a difference of the G-I with respect to the control group ($P < 0.01$). One of the marked effects of additives made with *Bacillus spp.* strains is to have a positive effect on the intestinal microbiota, in favor of reducing the presence of *E. coli*, staphylococci and clostridia, while increasing the presence of beneficial bacteria, such as *Lactobacillus spp.* and *Bifidobacterium spp.* (Forte *et al.* 2016, Li *et al.* 2016 and Medina *et al.* 2017). This makes the viability indicator favorable and therefore reduces the number of deaths.

las dietas en las que se adicionó un antibiótico. Nuñez *et al.* (2017), al evaluar el comportamiento productivo de pollos parrilleros suplementados con Eterogermina® en el agua de bebida, registraron diferencias para los indicadores peso y conversión, y no así para el consumo, lo que coincide con lo obtenido en el presente estudio. Estos resultados, que respaldan los del presente trabajo, confirman la importancia de los aditivos zootécnicos con efecto de tipo probiótico en las aves. Específicamente, el SUBTILPROBIO® E-44 demostró que los animales tratados hicieron un uso más eficiente de los nutrientes que aporta el alimento consumido, al obtener mayor peso vivo con un consumo similar de alimento.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos en los indicadores mortalidad y viabilidad. Para ambos se presenta diferencia del G-I con respecto al grupo control ($P < 0.01$). Uno de los efectos marcados que tienen los aditivos elaborados con cepas *Bacillus spp.* es el de incidir positivamente en la microbiota intestinal, a favor de la disminución de la presencia de *E. coli*, estafilococos y clostridios, al tiempo que se incrementa la presencia de bacterias beneficiosas, como *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.* (Forte *et al.* 2016, Li *et al.* 2016 y Medina *et al.* 2017). Esto hace favorable el indicador

Table 4. Health indicators up to the sixth week of the rearing cycle of heavy pure breeds E1birds, fed ad libitum with SUBTILPROBIO® E-44

Indicators	Treatments			SE ± Sign
	Breed standard	GI	GC	
Mortality, %	7.0	3.8	8.0	0.89 P=0.0031
Viability, %	93.0	96.2	92.0	0.08 P=0.0018

The means between the rows differ to $P < 0.05$ (Duncan 1955). The values were transformed to $\arcsen\sqrt{\%+0.375}$ and correspond to the original means

Rodríguez *et al.* (2015), who evaluated the effect of the inclusion of a probiotic mixture composed of *Lactobacillus salivarius* C65 and *Bacillus subtilis* E44 in birds of heavy pure breeds B4, obtained results very similar to those of this research. These authors observed improvements in the percentage of mortality and viability, in favor of treatment with the probiotic mixture. The value of this result lies in the application of the zootechnical additive SUBTILPROBIO® E-44 under production conditions, and the consequent improvement in mortality and viability indicators, regardless of the action of biological factors present in the animals and exogenous ones.

From the results obtained in this study, it could be inferred that the zootechnical additive SUBTILPROBIO® E-44, under the studied experimental conditions, shows real possibilities for its use in the heavy breeder category in the first six weeks of life. At present, this new zootechnical additive with probiotic activity constitutes a promising alternative with respect to the use of antibiotics as growth promoters.

viabilidad y por ende, disminuye el número de muertes.

Rodríguez *et al.* (2015), quienes evaluaron el efecto de la inclusión de una mezcla probiótica compuesta por *Lactobacillus salivarius* C65 y *Bacillus subtilis* E44 en aves de líneas puras pesadas B4, obtuvieron resultados muy semejantes a los de esta investigación. Estos autores observaron mejoras en el porcentaje de mortalidad y viabilidad, a favor del tratamiento con la mezcla probiótica. El valor de este resultado radica en la aplicación del aditivo zootécnico SUBTILPROBIO® E-44 en condiciones de producción, y la consiguiente mejora de los indicadores mortalidad y viabilidad, independientemente de la acción de factores biológicos presentes en los animales y de los de tipo exógeno.

A partir de los resultados obtenidos aquí se pudiera inferir que el aditivo zootécnico SUBTILPROBIO® E-44, en las condiciones experimentales estudiadas, muestra posibilidades reales para su uso en la categoría de reproductor pesado en las seis primeras semanas de vida. En los momentos actuales, este nuevo aditivo zootécnico con actividad probiótica constituye una alternativa promisoriosa con respecto al uso de antibióticos como promotores del crecimiento.

Acknowledgments

Thanks to the UEB Lines Puras Pesadas, from the Empresa Genética Avícola and Pie de Cría, for the support for the development of this study.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interests among them

Author's contribution

Grethel Milián Florido: Original idea, design the experiment, data analysis, manuscript writing

Marlen Rodríguez Oliva: Elaboration of the zootechnical additive, data analysis, manuscript writing

Onel González Espino: Conducting the experiment, data analysis

Julia Rondón Castillo: Elaboration of the zootechnical additive, data analysis, manuscript writing

Manuel Lázaro Pérez Quintana: Original idea, adviser the experimental design, manuscript review

Agustín Beruvides Rodríguez: Conducting the experiment, adviser the experimental design

Iraní Placeres Espinosa: Statistical analysis, data review

Agradecimientos

Se agradece a la UEB Líneas Puras Pesadas, de la Empresa Genética Avícola y Pie de Cría, por el apoyo para el desarrollo de este trabajo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses

Contribución de los autores al artículo

Grethel Milián Florido: idea original, diseño de la investigación, análisis de datos, escritura del manuscrito

Marlen Rodríguez Oliva: Elaboración del biopreparado, análisis de los resultados, escritura del manuscrito

Onel González Espino: Ejecución del experimento, análisis de los datos

Julia Rondón Castillo: Elaboración del biopreparado, escritura y revisión del manuscrito, análisis de los resultados

Manuel Lázaro Pérez Quintana: Idea original y asesoramiento del diseño del experimento, revisión del artículo

Agustín Beruvides Rodríguez: Ejecución del experimento y asesoramiento en el montaje del diseño experimental

Iraní Placeres Espinosa: Análisis estadístico de los datos y revisión del análisis de los resultados

References

- Arteaga, F., Laurencio, M.S., Rondón, A.J.C., Milián, G.F. & Boucourt, R.S. 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.
- Bai, K., Huang, Q., Zhang, J., Fields, G., Zhang, L. & Wang, T. 2016. "Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* fmbJ on growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of broiler chickens". *Poultry Science*, 96(1): 74-82, ISSN: 0032-5791, DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pew246>.
- Barros, M.V.C. 2018. Uso de probióticos en la alimentación de pollos broiler con diferente porcentaje de inclusión. Diploma Thesis. Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador, p.71.
- Beruvides, A., Elías, A., Valiño, E.C., Milián, G.F., Rodríguez, M. & González, R. 2018. "Comportamiento productivo y de salud en lechones lactantes suplementadas con azúcar fermentado con yogurt". *Livestock Research for Rural Development*, 30(4), Article #72, ISSN: 0121-3784, Available: <http://www.lrrd.org/lrrd30/4/agust30072.html>.
- Blanch, A. 2017. Probióticos, prebióticos y simbióticos. Available: <<https://avicultura.info/probioticos-prebioticos-y-simbioticos-en-la-nutricion-y-la-salud-de-las-aves/>>, [Consulted: October 14th, 2019].
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. InfoStat. Version 2012 [Windows]. Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available: <http://www.infostat.com.ar>.
- Díaz, L.E.A., Ángel-Isaza, J. & Ángel, D. 2017. "Probióticos en la avicultura: una revisión". *Revista de Medicina Veterinaria*, (35): 175-189, ISSN: 2389-8526, DOI: <http://dx.doi.org/10.19052/mv.4400>.
- Fisher, R.A. 1935. *The design of experiments*. Ed. Oliver & Boyd. Edinburgh, United Kingdom.
- Forte, C., Acuti, G., Manuali, E., Casagrande, P.P., Pavone, S., Trabalza, M.M. & Franciosini, M. 2016. "Effects of two different probiotics on microflora, morphology, and morphometry of gut in organic laying hens". *Poultry Science*, 95(11): 2528-2535, ISSN: 0032-5791, DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pew164>.
- Gao, P., Ma, C., Sun, Z., Wang, L., Huang, S., Su, X., Xu, J. & Zhang, H. 2017a. "Feed-additive probiotics accelerate yet antibiotics delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken". *Microbiome*, 5: 91-104, ISSN: 2049-2618, DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0315-1>.
- Gao, H., Wu, H., Shi, L., Zhang, X., Sheng, R., Yin, F. & Gooneratne, R. 2017b. "Study of *Bacillus subtilis* on growth performance, nutrition metabolism and intestinal microflora of 1 to 42 d broiler chickens". *Animal Nutrition*, 3(2): 109-113, ISSN: 2405-6383, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.02.002>.
- García-Hernández, Y., Pérez, S.T., Boucourt, R., Balcázar, J.L., Nicoli, J.R., Moreira, S.J., Rodríguez, Z., Fuertes, H., Nuñez, O., Albelo, N. & Halaihel, N. 2016. "Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production". *Research in Veterinary Science*, 108: 125-132, ISSN: 0034-5288, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.08.009>.
- Levene, H. 1960. Robust tests for the equality of variance. *Contributions to Probability and Statistics*. 1st Ed. Ed. Stanford

- University Press, Palo Alto, California, U.S.A., pp. 278-292.
- Li, Y., Xu, Q., Huang, Z., Lv, L., Liu, X., Yin, C., Yan, H. & Yuan, J. 2016. "Effect of *Bacillus subtilis* CGMCC 1.1086 on the growth performance and intestinal microbiota of broilers". *Journal of Applied Microbiology*, 120(1): 195-204, ISSN: 1365-2672, DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.12972>.
- Medina-Saavedra, T., Arroyo, G.F., Herrera, C.M. & Mexicano, L.S. 2017. "*Bacillus subtilis* as a probiotic in poultry farming: relevant aspects in recent research". *Abanico Veterinario*, 7(3): 14-20, ISSN: 2448-6132, DOI: <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2017.73.1>.
- Milián, G.F., Rodríguez, M.O., Díaz, D., Rondón, A.J.C., Pérez, M.Q., Boucourt, R., Rodríguez, M.O., Portilla, Y. & Beruvides, A. 2019b. "Evaluation of the zootechnical additive SUBTILPROBIO® C-31 on feeding of laying hens in a commercial production unit". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 53(2): 161-168, ISSN: 2079-3480.
- Milián, G.F., Rondón, A.J.C., Pérez, M.Q., Arteaga, F.G., Boucourt, R., Portilla, Y., Rodríguez, M.O., Pérez, Y. & Laurencio, M. 2017a. "Effect of zootechnical additives on productive and health indicators in broilers". *Pastos y Forrajes*, 40(4): 315-322, ISSN: 0864-0394.
- Milián, G.F., Rondón, A.J.C., Pérez, M.Q., Arteaga, F.G., Boucourt, R., Portilla, Y., Rodríguez, M.O., Pérez, Y. & Laurencio, M. 2017b. "Methodology for the isolation, identification and selection of *Bacillus spp.* strains for the preparation of animal additives". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(2): 197-207, ISSN: 2079-3480.
- Milián, G.F., Rondón, A.J.C., Pérez, M.Q., Martínez, Y., Boucourt, R., Rodríguez, M.O., Beruvides, A. & Portilla, Y. 2019a. "Stability of the zootechnical additives SUBTILPROBIO® C-31, C-34 and E-44 under different temperature conditions". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 53(3): 241-248, 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.
- Mozombite, C.F.T. 2018. Efecto del uso de dos niveles de un probiótico en el desempeño productivo de pollos parrilleros de la Línea Cobb 500 en fase de inicio. Diploma Thesis. Facultad de Zootecnia, Yurimaguas, Perú, 62p.
- Núñez, O., Arévalo, R., Kelly, G. & Guerrero, J.R. 2017. "Efecto de la Enterogermina (Esporas de *Bacillus clausii*) en el comportamiento Productivo de Pollos de Engorde". *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(4): 861-868, ISSN: 1682-3419, DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13882>.
- Ortiz, A., Yáñez, P., Gracia, M.I. & Mallo, J.J. 2013. Effect of probiotic Ecobiol on broiler performance. 19th European Symposium on Poultry Nutrition. Postdam, Brandeburg, Germany, Available: https://www.researchgate.net/publication/259751576_Effect_of_probiotic_Ecobiol_on_broiler_performance, [Consulted: October 14th, 2019].
- Pérez, M. 2000. Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica. PhD Thesis. Universidad Agraria de La Habana, Mayabeque, Cuba, p. 10.0
- Ramírez, A. 2014. La avicultura cubana: un futuro prometedor. Available: <http://www.elsitioavicola.com/articles/2561/la-avicultura-cubana-un-futuro-prometedor/>, [Consulted: September 10th, 2019].
- Rendón, L., Añez, M., Salvatierra, A., Meneses, R., Heredia, M. & Rodríguez, M. 2015. "Probióticos. Generalidades". *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, 74(8): 123-128, ISSN: 0004-0649.
- Rodríguez, M., Milián, M., Rondón, A.J., Bocourt, R., Beruvides, A. & Crespo, E. 2015. "Evaluation of a probiotic mixture in the started birds feeding of heavy pure breeds B4 in a production unit". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 49(4): 497-502, ISSN: 2079-3480.
- Rondón, A.J. 2009. Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación de su efecto probiótico en estos animales. PhD Thesis. Universidad Agraria de La Habana, Mayabeque, Cuba, 100 p.
- Shapiro, S. & Wilk, B. 1965. "An analysis of variance test for normality (complete samples)". *Biometrika*, 52(2): 591-611, ISSN: 1464-3510, DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/2333709>.
- Sosa, D., García, Y. & Dustet, J.C. 2018. "Development of probiotics for animal production. Experiences in Cuba". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 52(4): 1-17, ISSN: 2079-3480.
- Valdés, M.N. 2018. Proyecto para la evaluación del efecto de biopreparados probióticos en el cultivo intensivo de tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Diploma Thesis. Universidad de Matanzas, Cuba, p.75.
- Wang, X., Farnell, Y.Z., Peebles, E.D., Kiess, A.S., Wamsley, K.G.S. & Zhai, W. 2016. "Effects of prebiotics, probiotics, and their combination on growth performance, small intestine morphology, and resident *Lactobacillus* of male broilers". *Poultry Science*, 95(6): 1332-1340, ISSN: 0032-5791, DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pew030>.
- Zhang, Z.F., Cho, J.H. & Kim, I. 2013. "Effects of *Bacillus subtilis* UBT-MO2 on growth performance, immune organ relative weight, fecal gas concentration and intestinal microbial shedding in broiler chickens". *Livestock Science*, 155(2-3): 343-347, ISSN: 1871-1413, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.05.021>.

Received: June 18, 2020

Accepted: February 3, 2021