

## Evaluation of the zootechnical additive SUBTILPROBIO® C-31 on feeding of laying hens in a commercial production unit

### Evaluación del aditivo zootécnico SUBTILPROBIO® C-31 en la alimentación de gallinas ponedoras en una unidad de producción comercial

Grethel Milián<sup>1</sup>, Marlen Rodríguez<sup>1</sup>, Damarys Días<sup>2</sup>, Ana J. Rondón<sup>1</sup>, M. L. Pérez<sup>4</sup>, R. Boucourt<sup>3</sup>, Yadileiny Portilla<sup>5</sup> and A. Beruvides<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Combinado Avícola de Matanzas

<sup>3</sup>Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

<sup>4</sup>Universidad Estatal Amazónica. Km. 2 ½. Vía a Tena (Paso Lateral), Puyo, Pastaza. Departamento de Ciencias de la Tierra. Ecuador

<sup>5</sup>Universidad Autónoma de España, Madrid, España

Email: grethel.milian@umcc.cu

This study was conducted in a farm belonging to the Combinado Avícola de Matanzas, Cuba, using Leghorn L33 line laying hens, and lasted three months. The objective of this study was to evaluate the zootechnical additive SUBTILPROBIO® for feeding laying hens. This additive was produced with strains of *Bacillus subtilis*, subtilis C-31 subspecies, in a concentration of 10<sup>9</sup> endospores/g. The experiment was conducted according to a completely randomized design, with two treatments: group I, base diet (maize-soybean) and group II: base diet + SUBTILPROBIO® C-31. An amount of 600 hens, with a mean weight of 1,192 grams and 113 days old was used, divided into 300 hens/treatment. Hens were located in cages under similar conditions of management and feeding. In order to determine the probiotic effect of this zootechnical additive, liveweight, intake, conversion, total production of eggs and cracked eggs, and total disqualified eggs, as well as mortality, death by pecking, cannibalism and viability were evaluated. Results showed that hens consumed the zootechnical additive had a higher increase of productive indicators like liveweight (1640.0g/1585.0g), intake (10780 kg<sup>-1</sup> DM), conversion (1.92/2.10), egg production (15,540/15,397), cracked eggs (1,092/1,114) and disqualified eggs (69/76) for P<0.01 regarding control group. In other indicators like mortality (1/4), viability (99.6/98.6 %) and death by pecking/cannibalism (1/2), there are no differences among treatments. Results of this research demonstrate feasibility of the use of this zootechnical additive as improver of productive and health indicators for this category.

Key words: zootechnical additives, endospores of *Bacillus subtilis*, laying hens, eggs

Poultry production is currently one of the most important branches of animal production worldwide, which contributes at present to the satisfaction of more than 35 % of protein needs of the world population. This is achieved through the exploitation of two basic aspects that make up this branch: meat production and egg production (Peinado 2015 and FAO 2017).

The laying hen is one of the most efficient domestic animals since it is capable of producing more than 10 times its weight in eggs. This allows to convert food unfit for human intake into a proper source of

El trabajo se llevó a cabo en una unidad de producción, perteneciente al Combinado Avícola de Matanzas, Cuba y tuvo una duración de tres meses con gallinas ponedoras de la raza Leghorn Línea L33. El objetivo propuesto fue evaluar el aditivo zootécnico SUBTILPROBIO® en la alimentación de gallinas ponedoras. Este aditivo se elaboró con la cepa *Bacillus subtilis* subespecie subtilis C-31 en una concentración de 10<sup>9</sup> endosporas/g<sup>-1</sup>. El experimento se realizó según un diseño completamente aleatorizado, con dos tratamientos: Grupo I: dieta basal (maíz-soya) y Grupo II: dieta basal + SUBTILPROBIO® C-31. Se emplearon 600 aves con un peso promedio de 1 192 gramos y 113 días de nacidas, distribuidas en 300 aves/tratamiento. Las aves se ubicaron en jaulas en similares condiciones de manejo y alimentación. Para determinar el efecto probiótico de este aditivo zootécnico se evaluó el peso vivo, consumo, conversión, producción total de huevos, huevos cascados y total de huevos descalificados, así como la mortalidad, muerte por picaje y canibalismo, y viabilidad. Los resultados mostraron que las aves que consumieron el aditivo zootécnico tuvieron mayor incremento de los indicadores productivos: peso vivo (1640.0g/1585.0g), consumo (10780 kg<sup>-1</sup>MS) conversión (1.92/2.10), producción de huevos (15 540/15 397), huevos cascados (1092/1114) y descalificados (69/76) para P<0.01 con respecto al grupo control. Los indicadores mortalidad (1/4), viabilidad (99.6/98.6 %) y muerte por picaje/canibalismo (1/2) no tienen diferencias entre los tratamientos. Los resultados de la investigación exponen la factibilidad del uso de este aditivo zootécnico como mejorador de los indicadores productivos y de salud para esta categoría.

Palabras clave: aditivos zootécnicos, endosporas de *Bacillus subtilis*, gallinas ponedoras, huevos

La producción avícola constituye, actualmente, una de las ramas de la producción animal de mayor importancia a nivel mundial, lo que contribuye en estos momentos a la satisfacción de más de 35 % de las necesidades proteicas de la población mundial. Esto se logra a partir de la explotación de dos vertientes básicas que componen esta rama: la producción de carne y la producción de huevos (Peinado 2015 y FAO 2017).

La gallina ponedora es uno de los animales domésticos más eficientes ya que es capaz de producir más de 10 veces su peso en huevos, lo que permite convertir alimentos

protein for humans. For developing countries, poultry farming is an invaluable source that must be taken into account so that its people aspire to gradually satisfy their needs for protein intake in such a way that the economic balance is profitable enough to maintain an adequate and competitive production level (Lamazares 2000).

During the 90s, a set of products was developed that do not create the problems of microbial resistance or residual effect produced by antibiotics for poultry farming. They are grouped, generically, under the name of zootechnical additives, which can be microorganisms, mainly lactic bacteria, *Bacillus* endospores, fungi, yeasts or substances, which contribute to maintain a favorable ecological balance in the intestine and a good functioning of the immune system (Pérez *et al.* 2015 and Zhang *et al.* 2017). Among these additives, probiotics currently play an important role because they have the advantage of being natural and economic products that leave no residue in the final products, stimulate the immune system response and are animal productivity enhancers, which allows to obtain more productive, healthy and disease-resistant flocks (Carvalho *et al.* 2016). From the exposed elements, the objective of the following research was to evaluate the zootechnical additive SUBTILPROBIO® C-31, in the feeding of laying hens in a commercial production unit.

### Materials and Methods

*Treatments and experimental conditions.* This study was carried out in the Unidad Productiva- Económica de Base "Güira" belonging to the Combinado Avícola de Matanzas, Cuba, in the category of laying hens of Leghorn Line L33 breed. The evaluation was carried out in the months between March 5th and June 5th (14 weeks). During this period, mean temperature was  $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ; the maximum was  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ , and the minimum,  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$ . Mean relative humidity was  $78\% \pm 3$ . The experiment was carried out according to a completely randomized design, with two treatments: Group I: Basal diet (maize-soybean) and Group II: Basal diet + zootechnical additive SUBTILPROBIO® C-31. An amount of 600 hens, with a mean weight of 1,192 grams and 113 days old was used, divided into 300 hens/treatment.

*Elaboration of SUBTILPROBIO® zootechnical additive.* From the *Bacillus subtilis* sub *subtilis* C-31 strain (Milián *et al.* 2014), 20L of the product were elaborated according to the Milián *et al.* (2017).

*Diet.* Composition of the supplied diet met the requirements of the layer, shown in table 1. Food was offered twice a day in the form of maize-soybean meal, with a composition, according to NRP (1994), at a rate of 110 g per animal per day. The zootechnical additive was supplied in the G-II ration, in the morning hours, every day. It was manually mixed with the diet, at a

no aptos para el consumo humano en una debida fuente de proteína para el hombre. Para los países en vías de desarrollo la avicultura es una fuente inestimable que se debe tener en cuenta para que sus pueblos aspiren a satisfacer paulatinamente sus necesidades de consumo proteico de tal forma que el balance económico sea lo suficientemente rentable como para mantener un nivel de producción adecuado y competitivo (Lamazares 2000).

Durante la década del 90 del siglo pasado se desarrolló un conjunto de productos que no crean los problemas de resistencia microbiana o efecto residual que producen los antibióticos para la avicultura. Éstos se agrupan, genéricamente, bajo la denominación de aditivos zootécnicos los cuales pueden ser microorganismos, principalmente bacterias lácticas, endosporas de *Bacillus*, hongos, levaduras o sustancias, que contribuyen a mantener un equilibrio ecológico favorable en el intestino y buen funcionamiento del sistema inmunitario (Pérez *et al.* 2015 y Zhang *et al.* 2017). Dentro de estos aditivos, los probióticos desempeñan en la actualidad una importante labor porque tienen la ventaja de ser productos naturales y económicos que no dejan residuos en los productos finales, estimulan la respuesta del sistema inmune y son mejoradores de la productividad animal lo que permite obtener animales más productivos, saludables y resistentes a las enfermedades (Carvalho *et al.* 2016). A partir de los elementos expuestos, se propone como objetivo de la siguiente investigación evaluar el aditivo zootécnico SUBTILPROBIO® C-31, en la alimentación de gallinas ponedoras en una unidad de producción comercial.

### Materiales y Métodos

*Tratamientos y condiciones experimentales.* El presente trabajo se desarrolló en la Unidad Productiva-Económica de Base "Güira" perteneciente al Combinado Avícola de Matanzas, Cuba, en la categoría de gallinas ponedoras de la raza Leghorn Línea L33. La evaluación se realizó en los meses comprendidos entre el 5 de marzo y 5 de junio (14 semanas). Durante este período, la temperatura media fue de  $29^{\circ}\text{C} \pm 2$ , la máxima de  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ , y la mínima de  $28^{\circ}\text{C} \pm 3$ . La humedad relativa promedio fue de  $78\% \pm 3$ . El experimento se realizó según un diseño completamente aleatorizado, con dos tratamientos: Grupo I: dieta basal (maíz- soya) y Grupo II: dieta basal + aditivo zootécnico SUBTILPROBIO® C-31. Se emplearon 600 aves con un peso promedio de  $1\ 192 \pm 2$  gramos y 113 días de nacidas, con 300 aves distribuidas por tratamiento.

*Elaboración del aditivo zootécnico SUBTILPROBIO®.* A partir de la cepa de *Bacillus subtilis* subespecie *subtilis* C-31 (Milián *et al.* 2014), se elaboraron 20L del producto según la metodología Milián *et al.* (2017).

*Dieta.* La composición de la dieta que se suministró se muestra en la tabla 1, la cual cumplió con los requerimientos de la ponedora. El alimento se ofreció dos veces al día en forma de harina basada en maíz-soya, con una composición según NRP (1994) a razón de 110 g por animal por día. El aditivo zootécnico se

concentration of  $10^9$  CFU.g<sup>-1</sup>.

*Animal management.* Before the arrival of hens, the farm was subjected to a health rating, as established

suministró en la ración del G-II todos los días en el horario de la mañana, el cual se mezcló manualmente con la dieta, a una concentración de  $10^9$  UFC.g<sup>-1</sup>.

Table 1. Nutritional requirements for L33 laying hen

Components	%
Maize	65.77
Soybean meal	17.35
Fish meal	5.00
Diclacium phosphate	1.60
Calcium carbonate	8.73
DL-metionione	0.30
Premix of vitamins and minerals	1.00
Salt	0.25

by the Technical Instructions for the handling of layer (UCAN-IIA 2003). Hens were housed in metal cages with capacity for four hens, at a rate of 400-533 cm<sup>2</sup>/bird; they received *ad libitum* water through automatic nipples.

*Experimental procedure for sample analysis.* To determine the probiotic effect of the zootechnical additive, the birds under study were weighed at the beginning and at the end, intake (kg<sup>-1</sup> DM), and conversion (kg of food / kg of total eggs) were recorded, and all the eggs per each treatment were collected, in order to determine the number of postures, the total number of eggs that are broken and disqualified. Total of dead hens was also determined: (initial existence-final existence / initial existence) x 100 %, death by pecking and cannibalism: (total death by pecking and cannibalism / initial existence) x 100 % and viability percentage.

*Statistical processing.* For data analysis, INFOSTAT statistical software, version 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012) was used. An amount of 300 hens were selected per treatment, where each hen constituted an experimental unit. Differences among groups were verified through Duncan (1955) multiple range comparison test.

## Results and Discussion

Table 2 shows the results of the evaluation of SUBTILPROBIO® C-31 zootechnical additive in productive indicators: liveweight, intake and conversion. Hens that consumed the zootechnical additive showed a better performance in the indicator liveweight and conversion ( $P < 0.01$ ) at the end of the experiment, a result that reflects the veracity of the use of zootechnical additives with a marked probiotic effect. Egg conversion per each kilogram of consumed food by kilograms of total eggs is an indicator of productive efficiency of the unit, hence the results correlate with the above and it can be said that the G-II

*Manejo de los animales.* Antes del arribo de las aves, la nave de producción se sometió a una habilitación sanitaria, según lo establecido por el Instructivo Técnico para el manejo de la ponedora (UCAN-IIA 2003). Las aves se alojaron en jaulas metálicas con capacidad para cuatro gallinas, a razón de 400-533 cm<sup>2</sup>/ave y recibieron el agua *ad libitum* mediante tetinas automáticas.

*Procedimiento experimental para el análisis de las muestras.* Para determinar el efecto probiótico del aditivo zootécnico, las aves en estudio se pesaron al inicio y al final, se registró el consumo (kg<sup>-1</sup>MS), conversión (kg de alimento /kg de huevos totales) y se recogieron todos los huevos alojados por cada tratamiento para determinar el número de posturas, el total de huevos cascados y descalificados. También se determinó el total de aves muertas (existencia inicial-existencia final/existencia inicial) x 100%, muerte por picaje y canibalismo (total de muerte por picaje y canibalismo/ existencia inicial) x 100% y porcentaje de viabilidad.

*Procesamiento estadístico.* Para el análisis de los datos se utilizó el software estadístico INFOSTAT, versión 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012). Se seleccionaron 300 aves por tratamiento, donde cada ave constituyó una unidad experimental. Las diferencias entre grupo se verificaron a través de la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan (1955).

## Resultados y Discusión

En la tabla 2 se presentan los resultados de la evaluación del aditivo zootécnico SUBTILPROBIO® C-31 en indicadores productivos: peso vivo, consumo y conversión. Las aves que consumieron el aditivo zootécnico mostraron mejor comportamiento en el indicador peso vivo y conversión ( $P < 0.01$ ) al final del experimento, resultado que refleja la veracidad del uso de los aditivos zootécnicos con efecto marcado de tipo probiótico. La conversión en huevo por cada kilogramo de alimento consumido entre kilogramo de huevos totales es un indicador de la eficiencia productiva de la

made an efficient use of the nutrients provided in the feed from the inclusion of the zootechnical additive. These results are in the ranges reported in the Guía de manejo de ponedoras (2016) of the layer for these indicators.

According to Pérez *et al.* (2012), the use of probiotic biopreparations in laying hens is a routine practice in modern poultry production, which provides favorable results. These authors evaluated a probiotic mixture of *Lactobacillus salivarius* and the *Bacillus subtilis* strain E-44 in the commercial farm of layers "Baro Chiquito" and obtained differences between the group that received the probiotic and the control for the conversion indicator, similar to those obtained in this research.

unidad, de ahí que los resultados se correlacionan con lo antes expuesto y se puede decir que el G-II utilizó eficientemente los nutrientes aportados en el alimento a partir de la inclusión del aditivo zootécnico. Estos resultados se encuentran en los rangos reportados en el Guía de manejo de ponedoras (2016) de la ponedora para estos indicadores.

Según Pérez *et al.* (2012) el uso de biopreparados probióticos en gallinas ponedoras es una práctica de rutina en la producción avícola moderna, la cual aporta resultados favorables. Dichos autores evaluaron una mezcla probiótica de *Lactobacillus salivarius* y la cepa de *Bacillus subtilis* E-44 en la unidad de producción comercial de ponedoras "Baro Chiquito" y obtuvieron diferencias entre el grupo que recibió el probiótico y el

Table 2. Performance of productive indicators at the beginning and at the end of the experiment with the addition of the zootechnical additive SUBTILPROBIO® C-31 for 14 weeks

Indicators	Treatments		SE±Sign	
	G-I	G-II		
Liveweight (g)	Initial weight	1196.00	1192.00	1.5
	Final weight	1585.00	1640.00	1.1**
Intake (kg <sup>-1</sup> DM)		10780.00	10780.00	-
Conversion (kg of food/kg of total eggs)		2.10	1.92	1.2**

Means between lines differ at P<0.05 (Duncan 1955) \*\*P<0.01

One of the important elements that is taken into account in layer rearing is the balance in diets which will improve nutrient balance, timely use of synthetic amino acids, and some other aspects (Bermúdez 2012). Hence, the option of including zootechnical additives that are currently on the market, is a real possibility.

Research carried out by Pérez *et al.* (2012) and Rodríguez *et al.* (2016) demonstrated the effect of zootechnical additives in activating a group of mechanisms in animals of livestock interest, specifically in the layer category. In their research they showed how the nutritional value of diets is favored with the inclusion of these additives.

Studies carried out in other categories of birds were those obtained by Gamboa (2014) when the addition of a homemade microbial culture in broiler chickens was evaluated. This author obtained favorable results in productive and health indicators as weight gain (2,902.1 g vs. 2,564 g) and mortality (3.3% vs 8.3%).

Other inclusions of probiotics based on spores of *Bacillus spp.* in birds were reported by Boaro (2015) and Lie *et al.* (2015), who had similar results to those of this research for the productive indicator liveweight. Likewise, Cerón (2016) obtained similar results to this study when adjustments to diets were performed and reached body weights and optimal uniformity in the experimental birds.

The use of the zootechnical SUBTILPROBIO® C-31 additive in the diet of laying hens showed a positive

control para el indicador conversión, semejante a los obtenidos en esta investigación.

Uno de los elementos importantes que se tiene en cuenta en la crianza de la ponedora es el equilibrio que se logre establecer en las dietas, lo que permitirá mejorar el balance de los nutrientes, el uso oportuno de los aminoácidos sintéticos, entre otros (Bermúdez 2012). De ahí que la opción de incorporar los aditivos zootécnicos que se encuentran actualmente en el mercado, constituye una posibilidad real.

Investigaciones llevadas a cabo por Pérez *et al.* (2012) y Rodríguez *et al.* (2016) demostraron el efecto que tienen los aditivos zootécnicos en activar un grupo de mecanismos en los animales de interés pecuarios específicamente en la categoría de ponedoras. En sus investigaciones demostraron como se favorece el valor nutritivo de las dietas con la inclusión de estos aditivos.

Otros estudios con diferentes categorías de aves fueron los realizados por Gamboa (2014) cuando evaluó la adición de un cultivo microbiano casero en pollos parrilleros. Dicho autor logró resultados favorables en indicadores productivos y de salud como ganancia de peso (2 902,1 g vs 2 564 g) y mortalidad (3.3 % vs 8.3 %).

Boaro (2015) y Lie *et al.* (2015) reportaron otras inclusiones de probióticos basados en esporas de *Bacillus spp.* en aves, quienes obtuvieron resultados similares a los de esta investigación para el indicador productivo peso vivo. Similares resultados a este trabajo fueron los obtenidos por Cerón (2016) cuando realizó ajustes de dietas y logró pesos corporales y uniformidad óptima en las aves experimentales.

effect in terms of the number of postures, decrease in the number of broken and disqualified eggs with respect to GI group (control), which did not receive the additive, when comparing both groups at the end of the experiment, for a significance of ( $P < 0.01$ ). Table 3 shows the results.

El empleo del aditivo zootécnico SUBTILPROBIO® C-31 en la dieta de las gallinas ponedoras mostró efecto positivo en cuanto al número de posturas, disminución en el número de huevos cascados y descalificados con respecto al grupo G-I (control) que no recibió dicho aditivo, al comparar ambos grupos al final del

Table 3. Performance of the amount and quality of the egg, with the addition of the zootechnical additive SUBTILPROBIO® C-31 during 14 weeks

Indicators	Treatments		SE±Sign
	G-I	G-II	
Number of eggs	15397	15540	1.5**
Broken eggs	1114	1092	1.1**
Disqualified eggs	76	69	0.7**

Means between lines differ at  $P < 0.05$  (Duncan 1955) \*\* $P < 0.01$

Although the results in the group treated with the zootechnical additive were superior to the control, when evaluating the zootechnical response, it should be integrally assessed, and if their positive effect is true, it is important to point out that the environmental effect, adequate management and high potential of the layer favored this result. Herrera (2014) advocated taking these factors into account as this allows to obtain more eggs, which is translated into an improvement in the laying plateau.

Similar researches were carried out by Pérez *et al.* (2012), when they evaluated probiotic additives (SUBTILPROBIO® E-44 and PROBIOLACTIL® C65) with positive effects in terms of the number of eggs, as well as in the conversion of eggs per each kilogram of food consumed.

Guo *et al.* (2017) in studies with cultures of *B. subtilis* as probiotic in laying hens (Hy-Line Brown) of 28 weeks old, obtained an improvement in the resistance of egg shell.

Results of health indicators evaluated in both groups of animals are shown in table 4. These were favored by two factors, one the effect exerted by the zootechnical additive SUBTILPROBIO® C-31 in the intestinal microbiota in favor of the reduction of enteropathogens, which favored the decrease of the indicator total death and death by pecking/cannibalism, as well as, the viability of G-II with respect to the control group.

As a second, the study was performed with young hens at the start of laying. They were in a satisfactory health state, which helped no infectious outbreak occur in the experimental units during the entire experimental stage. Results are in correspondence with the exposed in the Guía de manejo de la ponedora (2016).

It is known that some the important effects of zootechnical additives are the nutrient digestibility modification, digestive mucosa development,

experimento para una significación de  $P < 0.01$ . Estos resultados se observan en la tabla 3.

A pesar de que los resultados del grupo tratado con el aditivo zootécnico fueron superiores que el control, cuando se evalúa la respuesta zootécnica se debe valorar de forma integral, si es cierto, el efecto positivo de estos, es de señalarse que el efecto ambiental, el manejo adecuado y el alto potencial de la ponedora favoreció este resultado. Herrera (2014) abogó por tener en cuenta estos factores pues esto permite obtener más huevos, lo que se traduce en una mejora de la meseta de puesta.

Pérez *et al.* (2012) realizaron investigaciones similares cuando evaluaron aditivos probióticos (SUBTILPROBIO® E-44 y PROBIOLACTIL® C65) con efectos positivos en cuanto al número de huevos, así como, en la conversión en huevo por cada kilogramo de alimento consumido.

Guo *et al.* (2017), en estudios con cultivos de *B. subtilis* como probiótico en gallinas ponedoras (Hy-Line Brown) de 28 semanas de edad, obtuvieron mejora en la resistencia de la cáscara del huevo.

Los resultados de los indicadores de salud evaluados en ambos grupos de animales se muestran en la tabla 4. Estos se vieron favorecidos por dos factores uno el efecto que ejerció el aditivo zootécnico SUBTILPROBIO® C-31 en la microbiota intestinal a favor de la disminución de enteropatógenos, lo que favoreció la disminución de los indicadores muertes totales y muerte por picaje/cannibalismo, así como, la viabilidad en el G-II con respecto al grupo control.

Como segundo factor se trabajó con aves jóvenes de inicio de puesta, que se encontraban en estado de salud satisfactorio, lo cual ayudó a que no se presentará ningún brote infeccioso en las naves de experimentación durante toda la etapa experimental. Los resultados están en correspondencia con lo expuesto en la Guía de manejo de la ponedora (2016).

Se conoce que dentro de los efectos importantes de los aditivos zootécnicos están la modificación de

Table 4. Response of health indicators in birds fed with the zootechnical additive SUBTILPROBIO® C-31 for 14 weeks.

Indicators	Treatments		SE
	G-I	G-II	
Mortality	4.0	1.0	0.02
Death by pecking/cannibalism	2.0	1.0	0.01
Viability (%)	98.6	99.6	0.99

reduction of colonization by pathogens, decrease of adverse effects of mycotoxins and modification of the immune response (Lourenço *et al.* 2016, Kizerwetter-Świda and Binek 2016 and Rodríguez 2017), so the results of this research are associated with these mechanisms.

According to Pérez *et al.* (2012), colibacillosis, erysipelas, coccidiosis, lymphatic leukosis and cannibalism are among the most common causes that influence on hen mortality, which were not detected during the development of the experiment.

Studies conducted by Milián *et al.* (2014) and Rodríguez *et al.* (2015) demonstrated the antibacterial effect of an enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* yeast and endospores of *Bacillus subtilis* E-44 in the prevention of infectious diseases in animals of zootechnical interest.

Ricke *et al.* (2015), when they applied the commercial prebiotic Biolex® MB40 (composed of mannan oligosaccharides) in conventionally bred chickens, found beneficial effects in the reduction of *Salmonella* in the treated animals. In contrast, other researchers obtained no differences among treatments by including live strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pediococcus acidilactici*, and yeast cell wall extract, individually or in combination (Purdum and Hahn 2016).

Regularly, literature reports that when yeast (*S. cerevisiae*) and derivatives of its wall are applied in the diet of birds, bacterial attacks decrease, intestinal bacterial populations are modified, improve the productive performance and nutrient digestibility, which decrease the number of deaths, which is component found in the provided additive (Jahanian and Ashnagar 2015 and Rodríguez 2017).

Mountzouris *et al.* (2015) evaluated the application of a zootechnical additive based on *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in the diet of broilers treated with *Salmonella enteritidis*. In this study, the effect of yeasts on the growth of animals and on the prevalence of pathogenic bacteria in the caeca, cloaca and carcass skin was determined through culture procedures, while the performance of cecal microbiota was characterized by real-time polymerase chain reaction (PCR). These authors concluded that when zootechnical feed additives were supplied independently of the strain used for producing them, there is an improvement of growth of

la digestibilidad de los nutrientes, el desarrollo de la mucosa digestiva, la reducción de la colonización por patógenos, la disminución de los efectos adversos de las micotoxinas y la modificación de la respuesta inmune (Lourenço *et al.* 2016, Kizerwetter-Świda y Binek 2016 y Rodríguez 2017), por lo que se asocian los resultados de esta investigación a estos mecanismos.

Según Pérez *et al.* (2012), las causas más comunes que inciden en la mortalidad de las gallinas son la colibacilosis, la erisipela, la coccidiosis, la leucosis linfática y el canibalismo, entre otras, las cuales no se detectaron durante el desarrollo del experimento.

Estudios realizados por Milián *et al.* (2014) y Rodríguez *et al.* (2015) demostraron el efecto antibacteriano que tiene un hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y endosporas de *Bacillus subtilis* E-44 en la prevención de enfermedades infecciosas en animales de interés zootécnico.

Ricke *et al.* (2015), cuando aplicaron el prebiótico comercial Biolex® MB40 (compuesto por oligosacáridos de manano) en pollos criados convencionalmente, encontraron efectos beneficiosos en la reducción de *Salmonella* en los animales que se trataron. En contraste, otros investigadores no obtuvieron diferencias entre los tratamientos al incluir cepas vivas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pediococcus acidilactici* y extracto de pared celular de levadura, de forma individual o en combinación (Purdum y Hahn 2016).

Regularmente, en la literatura se informa que cuando se aplican levaduras (*S. cerevisiae*) y derivados de su pared en la dieta de las aves, disminuyen los ataques bacterianos, se modifican las poblaciones bacterianas intestinales, mejoran el rendimiento productivo y la digestibilidad de los nutrientes, lo que favorece a la disminución de las muertes en las aves, componente este que se encuentra en el aditivo que se suministró (Jahanian y Ashnagar 2015 y Rodríguez 2017).

Mountzouris *et al.* (2015) evaluaron la aplicación de un aditivo zootécnico basado en *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* en la dieta de pollos de engorde tratados con *Salmonella enteritidis*. En dicho trabajo se determinó el efecto de las levaduras en el crecimiento de los animales y en la prevalencia de la bacteria patógena en los ciegos, la cloaca y la piel de la canal a través de procedimientos de cultivo, mientras que el comportamiento de la microbiota cecal se caracterizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (RCP) en tiempo real. Estos

birds, increase of eggs, the improvement of their quality and their health status is improved, which shows a decrease of mortality indicator and favors the viability of treated animals.

Several experiences show that the use of strains of *Bacillus spp.* have an important function in reducing and even preventing intestinal colonization of *Salmonella spp.* González (2016) provided a suspension of endospores of *B. subtilis* specific pathogen-free chickens before treating them with *S. enteritidis* and *C. perfringens*. According to the authors, the treatment with *B. subtilis* suppresses completely the persistence and colonization of both germs and favors the increase of productive indicators with a low mortality, reason why it is inferred that the results of this research correlate with the previously mentioned facts.

In this sense, Corrigan *et al.* (2015) studied the effects of these probiotic compounds on the microbial community and on the physiology of the caeca of these birds, and determined that they can modify the microbiota with the increase of Bacteroides. It means that the native or beneficial bacteria proliferate, and mortality levels and cannibalism incidence in this birds are reduced.

As a conclusion, the results obtained reflect a multifactorial probiotic response, where there is an incidence in the productive and health indicators. Animals treated with the SUBTILPROBIO® C-31 zootechnical additive showed favorable results for both indicators. Therefore, it can be stated that this additive is a promising, viable, ecological and sustainable alternative in current Cuban poultry industry.

autores concluyeron que cuando se suministraron aditivos zootécnicos independientemente de la cepa que se utilice para su elaboración, se mejora el crecimiento de las aves, el incremento de huevos, mejora su calidad y se favorece el estado de salud en las aves por lo que se manifiesta una disminución en el indicador mortalidad y favorece la viabilidad de los animales tratados.

Diversas experiencias demuestran que el empleo de cepas de *Bacillus spp.* desempeñan una labor importante para reducir e incluso prevenir la colonización intestinal de *Salmonella spp.* González (2016) administraron a pollos libres de patógenos específicos una suspensión de endosporas de *B. subtilis* antes de tratarlos con *S. enteritidis* y *C. perfringens*. Según los autores, el tratamiento con *B. subtilis* suprime completamente la persistencia y colonización de ambos gérmenes y favorece el incremento de los indicadores productivos con una baja mortalidad, por lo que se infiere que los resultados de esta investigación se correlacionan con lo antes planteado.

En este sentido, Corrigan *et al.* (2015) estudiaron los efectos de estos compuestos probióticos en la comunidad microbiana y en la fisiología de los ciegos de las aves y determinaron que pueden modificar la microbiota con el incremento de Bacteroides, o sea, proliferan las bacterias nativas o beneficiosas y se reducen los niveles de mortalidad y la incidencia de canibalismo en las aves.

De forma general se puede arribar a la siguiente conclusión, que los resultados reflejan una respuesta probiótica de tipo multifactorial, donde hay incidencia en los indicadores productivos y de salud. Las aves tratadas con el aditivo zootécnico SUBTILPROBIO® C-31, demostraron resultados favorables para ambos indicadores. Por lo que se puede aseverar que este aditivo es una alternativa prometedor, viable, ecológica y sostenible en la industria avícola actual de Cuba.

## References

- Bermúdez, J. J. 2012. Estudio de campo sobre la intensidad de la luz de las ponedoras en Cuba. In: IV Congreso de Avicultura. ISBN 959-7131-05-6. La Habana, Cuba
- Boaro, B. 2015. Análisis histomorfométricos y ultraestructurales de la mucosa intestinal del pollo de engorde presentada al tratamiento por probiótico diferentes rutas y desafío con *Salmonella enteritidis*. Graduated Thesis. Universidad Estadual Paulista. 93p. Available: <<http://base.repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/12656/6/000833104>>
- Carvalho, T.S. G., Zangeronimo, M. G., Saad, C. E. P., Alvarenga, R. R. & Assis, V. D. L. 2016. Behaviour of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) at two temperatures in captivity. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec: 67 (6):1669-1674
- Cerón, M. M. F. 2016. Modelación de funciones de crecimiento aplicadas a la producción animal. Rev. Colombiana. Ciencias Pecuarias. 21 (1):39-58. ISSN: 0120-0690
- Corrigan, A., Leeuw, M., Penaud-Frézet, S., Dimova, D. & Murphy, R. A. 2015. Phylogenetic and Functional Alterations in Bacterial Community Compositions in Broiler Ceca as a Result of Mannan Oligosaccharide Supplementation. American Society for Microbiology. 81 (10): 3460-3470. DOI: 10.1128/AEM.04194-14
- 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
- FAO (Organización Mundial de la Alimentación). 2017. Base de datos estadísticos. Consumo mundial de huevo se ubica en 300 por persona. Roma, Available: <[http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)>, [Consulted: octubre 18, 2018]
- Gamboa, G. 2014. Adición de un cultivo microbiano casero en la dieta alimenticia de pollos parrilleros. Graduated Thesis, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador, 95 p. Available: <<http://repo.uta.edu.ec/handle/123456789/872>>
- González, P. I. R. 2016. Evaluación de probióticos sobre los índices productivos y la morfometría de las vellosidades intestinales en pollos de engorde. Graduated Thesis, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador, 72p. Available: <<http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/872>>

- edu.ec/jspui/handle/123456789/23314>
- Guía de Manejo de Ponedoras. 2016. Sistemas en aviarios y en graneros. Hy-Line® W-80. Available: <<http://www.hylinemqa.com>>.80.AL.T.COM.NA.SPN 1-18
- Guo, J., Dong, X., Liu, S. & Tong, J. 2017. Effects of long-term *Bacillus subtilis* CGMCC 1.921 supplementation on performance, egg quality, and fecal and cecal microbiota of laying hens. *Poultry Science*. 96 (5): 1280-1289. doi: 10.3382/ps/pew389.
- Herrera, G. M. 2014. Caracterización y manejo de un sistema de alimentación alternativo para pollos de cuello desnudo heterocigotos en pastoreo. PhD Thesis. Mayabeque, La Habana, Cuba, 100 p.
- Jahaniyan, R. & Ashnagar, M. 2015. Effect of dietary supplementation of mannan-oligosaccharides on performance, blood metabolites, ileal nutrient digestibility, and gut microflora in *Escherichia coli*-challenged laying hens. *Poultry Science*. 94 (9):2165-2172. DOI: 10-3382/ps/pev 180
- Kizerwetter-Świda, M. & Binek, M. 2016. Assessment of potentially probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from chickens. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 19 (1):15–20. DOI 10.1515/pjvs-2016-0003
- Lamazares, J. J. 2000. Programa de preparación de las pollonas para el comienzo de la postura. In: III Congreso Nacional de Avicultura. Memorias. Centro de Convenciones Plaza América. Varadero. Cuba: 122-123
- Lie, X., Piao, X., Ru, Y., Zhang, H., Péron, A. & Zhang, H. 2015. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* based direct fed microbial on performance, nutrient utilization, intestinal morphology and cecal microflora in broiler chickens. *Asian-Australas J Anim Sci* 28 (2):239–246. <<http://dx.doi.org/10.5713/ajas.14.0330>>.
- Lourenço, M. C., de Souza, A. M., Hayashi, R. M., da Silva, A. B. & Santin, E. 2016. Immune response of broiler chickens supplemented with prebiotic from *Sacharomyces cerevisiae* challenged with *Salmonella enteritidis* or Minnesota. *Poultry Science Association Inc*. 25 (2):165-172. DOI: 10.3382/japr/pfv 094
- Milián, G., Rondón, A. J., Pérez, M.,Arteaga, F., Bocourt, R., Portilla, Y., Rodríguez, M.,Pérez, Y., Beruvides, A. & Laurencio, M. 2017. 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., 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.
- Mountzouris, K. C., Dalaka, E., Palamidi, I., Paraskeuas, V., Demey, V., Theodoropoulos, G. & Fegeros, K. 2015. Evaluation of yeast dietary supplementation in broilers challenged or not with Salmonella on growth performance, cecal microbiota composition and Salmonella in ceca, cloacae and carcass skin. *Poultry Science Association Inc*. 94(10):2445-55.doi: 10.3382/ps/pev243
- NRP. 1994. Nutrient requirements of poultry. 9 th rev.ed. Board of Agriculture, National Academy Press.Washington DC. 157 p.
- Peinado, M.J.R. 2015. Efectos de nuevos aditivos alimentarios sobre la composición de la microbiota digestiva en pollos de broiler. PhD Thesis, Instituto de Nutrición Animal, Granada, España, 204 p.
- Pérez, M., Laurencio, M., Milián, G., Rondón, A., Arteaga, F., Rodríguez, M. & Borges, Y. 2012. Evaluation of a probiotic mixture on laying hens feeding in a commercial farm. *Pastos y Forrajes*. 35 (3): 311-320. Scielo.sld.cu
- Pérez, M. Q., Milián, F.G., Rondó. A. J., Bocourt. R. S. & 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*; 35:89-94, ISSN: 1315-2556.
- Purdum, S. & Hahn, D. D. 2016. Prebiotics and probiotics used alone or in combination and effects on pullet growth and intestinal microbiology. *J Appl Poult Res* 25 (1): 1-11. <<http://dx.doi.org/10.3382/japr/pfv 051>>.
- Ricke, C., Park, H. & Lee, S. 2016. Assessment of cecal microbiota, integron occurrence, fermentation responses, and Salmonella frequency in conventionally raised broilers fed a commercial yeast-based prebiotic compound. *Poultry Science*. 95 (1): 144-153. DOI: 10-3382/ps/pev 322
- Rodríguez, M. 2017. Evaluación de la capacidad antibacteriana de PROBIOLEV® frente a bacterias patógenas. PhD Thesis, Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba, 100 p.
- Rodríguez, M., Milián, G., Rondón, A. J., Bocourt, R., Beruvidez, A. & Crespo, E. 2016. 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.
- Rodríguez, M., Milián, G., Rondón, A. J., Bocourt, R., Portilla, Y., Laurencio, M. & Beruvidez, A. 2015. Hidrolizado enzimático de *Sacharomyces cerevisiae*: un aditivo con potencial antibacteriano para la alimentación animal. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 49 (3): 389 – 397, ISSN: 2079-3480.
- UCAN-IIA. 2003. Instructivo técnico de ponedoras y sus reemplazos. Tecnología de crianza y regulaciones sanitarias. Ministerio de la Agricultura. Unión Combinado Avícola Nacional. Instituto de Investigaciones Avícolas. La Habana, Cuba, 3p.
- Zhang, H., Pengfei, G., Chen, M., Zheng, S., Lifeng, W., Shi, H., Xiaoquan, S. & Jian X. 2017. Feed-additive probiotics accelerate yet antibiotics delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken. *Microbiome*. 5 (91): 1-14. DOI 10.1186/s40168-017-0315-1