

Evaluation of a probiotic mixture in the started birds feeding of heavy pure breeds B₄ in a production unit

Evaluación de una mezcla probiótica en la alimentación de aves de inicio de líneas puras pesadas B₄ en una unidad de producción

Marlen Rodríguez¹, Grethel Milián¹, Ana J. Rondón¹, R. Bocourt², A., Beruvidez¹ and Elayne Crespo³

¹Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas, Matanzas, C.P. 44740, Cuba.

²Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, C.P. 3200, Cuba.

³Empresa Genética Avícola y Pie de Cría, Matanzas, C.P. 10400, Cuba.

Email: marlen.rodriguez@umcc.cu

In order to evaluate the effect of the inclusion of a probiotic mixture (bio-preparation) based on *Lactobacillus salivarius* C65 and *Bacillus subtilis* E44 strains on the diet of started birds of heavy pure breeds, a research was conducted at the Unidad Genética Avícola "Granma" from Pedro Betancourt municipality, Matanzas. The study was carried out in a period of 35 days, between December 2013 and January 2014. The design was completely randomized and two treatments were evaluated: T1) basal diet (control) and T2) basal diet plus bio-preparations mixture, in ratio 1:1. A total of 600 heavy pure breeds B₄ birds were used, (300 per treatment) with an average weight of 42 grams at birth. They stayed on floor under similar management and feeding conditions. The liveweight, intake, conversion in weight per kilogram of intake food, mortality and birds viability was determined. The animals that received the probiotic mixture had a high liveweight during the rearing, except in the first two weeks, in which there were not differences between treatments. There were differences ($P < 0.05$) in the conversion per bird and the mortality percentage and viability, in favor of the treatment with the probiotic mixture. It concludes that it is possible to use this bio-preparation in the started birds feeding of heavy pure breeds, since the best biometric results were found in the group of birds treated with the animal additive.

Key words: *probiotic mixture, heavy pure breeds*

Introduction

The introduction of new products and technologies for the obtaining of healthy foods, which allows high productions with an appropriate sustainability, is a priority in the politics for animal production in Cuba. In this context, many authors agree in that the probiotics could be useful in the improvement of zootechnical indicators in animals of economic interest (Pérez *et al.* 2012 and Milián *et al.* 2014).

The microorganisms more used as probiotics are the lactic acid bacteria (especially *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*), yeasts (mainly the *Saccharomyces* genus) and bacteria from *Bacillus* genus and their endospores. All of them are part of bio-preparations that are in the international market (González-Núñez *et al.* 2013 and Carro *et al.* 2014).

The probiotic mixtures are constituted by two or more of these microorganisms, generally isolated from the digestive tract of healthy adult animals (Brizuela, 2011). Today it is recognized the importance and possible

Para evaluar el efecto de inclusión de una mezcla probiótica (biopreparado) basada en las cepas *Lactobacillus salivarius* C65 y *Bacillus subtilis* E44, en la dieta de aves de inicio de líneas puras pesadas, se realizó una investigación en la Unidad Genética Avícola "Granma", del municipio Pedro Betancourt, Matanzas, en un período de 35 d, entre diciembre de 2013 y enero de 2014. El diseño fue completamente aleatorizado y se evaluaron dos tratamientos: T1) dieta basal (control) y T2) dieta basal más la mezcla de biopreparados, en proporción 1:1. Se utilizaron 600 aves de la línea Pura Pesada B₄, (300 por tratamiento) con peso promedio de 42 g al nacer. Se alojaron en piso, en similares condiciones de manejo y alimentación. Se determinó el peso vivo, el consumo, la conversión en peso por kilogramo de alimento consumido, la mortalidad y la viabilidad de las aves. Los animales que recibieron la mezcla probiótica tuvieron mayor peso vivo en toda la crianza, excepto en las primeras dos semanas, en la que no se manifestaron diferencias entre tratamientos. Hubo diferencias ($P < 0.05$) en la conversión por ave, el porcentaje de mortalidad y viabilidad, a favor del tratamiento con la mezcla probiótica. Se concluye que es posible utilizar este biopreparado en la alimentación de aves de inicio de líneas puras pesadas, ya que los mejores resultados se encontraron en el grupo de aves tratadas con el aditivo zootécnico.

Palabras clave: *mezcla probiótica, líneas puras pesadas*

Introducción

La introducción de nuevos productos y tecnologías para la obtención de alimentos sanos, que permitan altas producciones con adecuada sostenibilidad, es una prioridad en la política para la producción animal en Cuba. En este contexto, muchos autores coinciden en que los probióticos pudieran ser útiles para mejorar los indicadores zootécnicos en animales de interés económico (Pérez *et al.* 2012 y Milián *et al.* 2014).

Los microorganismos más utilizados como probióticos son las bacterias ácido lácticas (especialmente *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*), las levaduras (fundamentalmente las del género *Saccharomyces*) y las bacterias del género *Bacillus* y sus endosporas. Todas forman parte de biopreparados que se encuentran en el mercado internacional (González-Núñez *et al.* 2013 y Carro *et al.* 2014).

Las mezclas probióticas están constituidas por dos o más de estos microorganismos, generalmente aislados del tracto digestivo de animales adultos saludables (Brizuela 2011). Hoy en día se reconoce la importancia

effectiveness of biotic therapy (probiotics and prebiotics) as medical tool in animal production (García *et al.* 2012).

In Cuba, the Empresa Genética y Pie de Cría has as main social object the maintenance and improvement of the heavy pure breeds. With its production guarantees the replacement of all basic birds from the national system and prevents the country has to invest to import replacement regularly. This allows guaranteeing poultry genetic basis and the existing breeds, besides to favor the raising of meat and eggs yield, as well as the production and marketing of the heavy foundation stock in Poultry Enterprises (Godínez 2012).

The objective of this research was to evaluate the effect of the inclusion of a probiotic mixture (biopreparation) based on *Lactobacillus salivarius* C65 and *Bacillus subtilis* E44 strains on the diet of started birds of heavy pure breeds, B₄.

Materials and Methods

Preparation of the bacterial bio-preparation. From the *Lactobacillus salivarius* C65 and *Bacillus subtilis* E44 strains, 20L of probiotic mixture were elaborated. For these flasks with 1L of Mann, Rogosa, Sharper (MRS) media and nutrient medium for *Lactobacillus* and *Bacillus* were prepared, respectively. They were inoculated and cultured at 37 °C during 18h. Then, was added 250 mL of inoculums in four Erlenmeyer of 6L, which contained 5L of medium for *Lactobacillus salivarius* or MCLs growth (Rondón 2009). For *Bacillus* growth the *Bacillus subtilis* (MCBs) growth medium described by Milian (2009) was used. Both cultures were stayed at 37 °C during 20h, under static conditions for *Lactobacillus* and with agitation at 250 rpm for *Bacillus*. After this time, viable counts and pH measure were carried out, to check the biopreparation quality. They were packaged in sterile flasks of 1L, with rubber top and were conserved at 5 °C until their use. The cultures were mixed into equal parts at the time of the application.

Experimental conditions. Treatments. The experiment was conducted at the Unidad Genética Avícola "Granma" from Pedro Betancourt municipality, Matanzas. The evaluation of the *in vivo* bio-preparation was carried out during 35 days between December/2013 and January/2014. The design was completely randomized with two treatments: T1) basal diet (control) and T2) basal diet plus bio-preparations mixture, in ratio 1:1. A total of 600 heavy pure breeds B₄ birds were used, distributed in 300 birds per treatment.

Birds management. The animals management was homogeneous in both groups, coinciding with the stated in the Technical Instructive No 7 UCAN -IIA (1998) for the evaluated species and category. The bio-preparation was given in the ration of the T2 group, in the morning twice a week. It was manually mixed with the diet, at

y posible eficacia de la terapia biótica (probióticos y prebióticos) como herramienta médica en la producción animal (García *et al.* 2012).

En Cuba, la Empresa Genética y Pie de Cría tiene como objeto social principal el mantenimiento y mejora de las líneas puras pesadas. Con su producción garantiza el reemplazo de todas las aves básicas del sistema nacional y evita que el país tenga que invertir para importar reemplazos regularmente. Esto permite garantizar el genofondo genético de la avicultura y las razas existentes, además de propiciar la elevación de los rendimientos de carne y huevo, así como la producción y comercialización de los pies de crías pesadas en las Empresas Avícolas (Godínez 2012).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inclusión de una mezcla probiótica (biopreparado) basada en las cepas *Lactobacillus salivarius* C65 y *Bacillus subtilis* E44., en la dieta de aves de inicio de líneas puras pesadas B₄.

Materiales y Métodos

Elaboración del biopreparado bacteriano: A partir de las cepas de *Lactobacillus salivarius* C65 y de *Bacillus subtilis* E44, se elaboraron 20 L de la mezcla probiótica. Para ello se prepararon frascos con 1 L de caldo Mann, Rogosa, Sharper (MRS) y caldo nutriente para *Lactobacillus* y *Bacillus*, respectivamente. Estos se inocularon y cultivaron a 37 °C por 18 h. A continuación, se añadieron 250 mL de inóculo en cuatro Erlenmeyers de 6 L de capacidad, que contenían 5 L de medio para crecimiento de *Lactobacillus salivarius* o MCLs (Rondón 2009). Para el crecimiento de *Bacillus* se utilizó el medio de crecimiento de *Bacillus subtilis* (MCBs) descrito por Milián (2009). Ambos cultivos se mantuvieron a 37 °C durante 20 h, en condiciones estáticas para *Lactobacillus* y con agitación a 250 rpm para *Bacillus*. Después de este tiempo, se realizaron los conteos de viables y la medición del pH, para comprobar la calidad de los biopreparados. Estos se envasaron en frascos estériles de 1 L, con tapa de goma y se conservaron a 5 °C hasta su utilización. Los cultivos se mezclaron en partes iguales en el momento de la aplicación.

Condiciones experimentales. Tratamientos. El experimento se desarrolló en la Unidad Genética Avícola "Granma" del municipio Pedro Betancourt, en la provincia de Matanzas. La evaluación del biopreparado *in vivo* se realizó durante 35 d en un período comprendido entre los meses diciembre/2013 y enero/2014. El diseño del experimento fue completamente aleatorizado, con dos tratamientos: T1) dieta basal (control) y T2) dieta basal más la mezcla de biopreparados, en proporción 1:1. Se utilizaron 600 aves de inicio de la línea pura pesada B₄, distribuidas en 300 aves por tratamiento.

Manejo de las aves. El manejo de los animales fue homogéneo en ambos grupos, lo que coincide con lo establecido en el Instructivo Técnico No 7 UCAN -IIA (1998) para la especie y categoría evaluada. El biopreparado se suministró en la ración del grupo T2,

a concentration of 10^9 UFC.mL⁻¹, which is equivalent to 10^9 endospores of *Bacillus* g⁻¹ concentrate. The dose was fitted according to the criteria proposed by Mutus *et al.* (2006) and Milián (2009).

Evaluation of the bio-preparation effect on started birds from heavy pure breeds B_p under production conditions. To evaluate the *in vivo* probiotic effect of the microbial biopreparation, the average liveweight of birds per treatment was determined weekly. The food intake and the conversion in weight per kilogram of food intake were determined. The mortality percentage was also calculated during the weeks of the experiment. It was also taking into account all parameters evaluated as a result of the biometric performed at 35 days. These indicators were calculated as described in the Technical Instructive for broiler rearing (UCAN- IIA, 1998).

Statistical processing of the in vivo evaluation. To analyze the results, the statistical Software INFOSTAT version 1 was used (Balzarini *et al.* 2001). For the statistical treatment of data variance analysis with completely randomized design were carried out and to verify significant differences between treatments the Duncan (1995) comparison test was used for a 95% reliability. The mortality and viability values were transformed to $\arcsen \sqrt{\% + 0,375}$

Results and Discussion

The liveweight variation per week of rearing with the use of probiotic mixture is showed in table 1.

The birds that received the additive in diet exceed those of the control treatment in this indicator. There were significant differences ($P < 0.01$) in favor of this treatment (T2), from the third evaluated week.

When probiotics are incorporated in the food as additive, an eubiosis state occurs and promotes a physiological effect on the organism, more than its nutritive value (Khasefidi and Goorchi 2006). The probiotics positive effects not only occur at the gastrointestinal tract (GIT), but are reflected in animal results as liveweight gain and the feed conversion improvement (Gil and Gil- Turnes 2005).

Khaksefidi and Ghoorchi (2006) obtained weight increase in chickens after supplying in diets, *Bacillus subtilis* cultures at 50 mg.Kg⁻¹ of concentrate. These

en el horario de la mañana, dos veces por semana. Se mezcló manualmente con la dieta, a concentración de 10^9 UFC.mL⁻¹, lo que equivale a 10^9 endosporas de *Bacillus* g⁻¹ de concentrado. La dosis se ajustó según los criterios propuestos por Mutus *et al.* (2006) y Milián (2009).

Evaluación del efecto del biopreparado en aves de inicio de la línea pura pesada B_p en condiciones de producción. Para evaluar el efecto probiótico *in vivo* del biopreparado microbiano, se determinó semanalmente el peso vivo promedio de las aves por cada tratamiento. Se determinó el consumo de alimento y la conversión en peso por kilogramo de alimento consumido. También se calculó el porcentaje de mortalidad durante las semanas que duró el experimento. Además, se tuvo en cuenta todos los parámetros evaluados como resultado de la biometría realizada a los 35 d. Estos indicadores se calcularon como se describe en el Instructivo técnico para la crianza del pollo de ceba (UCAN- IIA, 1998).

Procesamiento estadístico de la evaluación in vivo. Para el análisis de los resultados, se utilizó el Software estadístico INFOSTAT versión 1 (Balzarini *et al.* 2001). Para el tratamiento estadístico de los datos se realizaron análisis de varianza con diseño completamente aleatorizado y para verificar diferencias significativas entre tratamientos se utilizó la prueba de comparación de Duncan (1955) para 95 % de confiabilidad. Los valores de mortalidad y viabilidad fueron transformados a $\arcsen \sqrt{\% + 0,375}$

Resultados y Discusión

En la tabla 1 se muestra la variación del peso vivo por semana de crianza con el empleo de la mezcla probiótica.

Las aves que recibieron el aditivo en la dieta superaron a las del tratamiento control en este indicador. Se produjeron diferencias significativas ($P < 0.01$) a favor de dicho tratamiento (T2), a partir de la tercera semana evaluada.

Cuando los probióticos son incorporados en el alimento como aditivo, se produce un estado de eubiosis y se promueve un efecto fisiológico en el organismo, más allá de su valor nutritivo (Khasefidi y Goorchi 2006). Los efectos positivos de los probióticos no solo se presentan a nivel del tracto gastrointestinal (TGI), sino que se reflejan en resultados zootécnicos como la ganancia de peso vivo y la mejora de la conversión alimenticia (Gil y Gil- Turnes 2005).

Table 1. Results of the liveweight per weeks

Weeks	Live weight		
	T 1	T 2	Standard
1	158 ^a	156 ^a	155
2	394 ^a	390 ^a	370
3	777 ^b	793 ^a	740
4	1220 ^b	1249 ^a	1100
5	1523 ^b	1587 ^a	1440

^{ab}Different letters indicate significant differences between treatments in a week for $P < 0.05$ (Duncan 1955)

authors refers that differences ($P < 0.01$) in the animals daily liveweight were presented.

When performing the corresponding biometric at 35 days of age, significant differences between treatments were observed (table 2).

The use of *L. salivarius* and *B. subtilis* mixture in birds diets represented an improvement in all the evaluated indicators. The liveweight at the end of the

Khaksefidi y Ghoorchi (2006) obtuvieron incrementos de peso en pollos después de suministrar en las dietas, cultivos de *Bacillus subtilis* a razón de 50 mg.kg⁻¹ de concentrado. Estos autores refieren que se presentaron diferencias ($P < 0.01$) en el peso vivo diario de los animales.

Al realizar la biometría correspondiente a los 35 d de edad, se observaron diferencias significativas entre tratamientos (tabla 2).

Table 2. Results of biometrics at 35 days of age

Evaluated indicators	Year: 2013-2014		
	T1	T2	Standard
Live weight (g)	1523 ^b	1587 ^a	1440
Intake/bird (kg)	3.42 ^a	3.46 ^a	3.28
Conversion	2.27 ^b	2.15 ^a	2.29
Uniformity (%)	83 %	91 %	82 %
Mortality	18 (6.00)	11 (3.66)	12
Viability (%)	94	96,3	96

^{ab}Different letters indicate significant differences between treatments in a week for $P < 0.05$ (Duncan 1955)

rearing and meat conversion per each kilogram of food intake, was better regarding the animals that did not received this microbial mixture.

The indicators evaluated in both groups are above the technical instructive indicators, used as comparison criteria. This supposed a positive control under very controlled conditions for the facilities of the Unión de Empresas del Combinado Avícola Nacional (UECAN).

The viability of birds was one of the parameters taken into account in health indicators during the experimental stage. In this case, the higher viability percentage corresponds to the birds treated with the bio-preparation. The group of birds that did not intake the probiotic mixture, not only resulted with lower viability, but they were not able to reach the percentage required by the standard line. According to Kizerwetter-Swida and Binek (2009), probiotics microorganisms, when acting, maintain a beneficial microflora in the animal and exclude those potentially pathogenic microorganisms. This supposes to be the cause for which the group of treated birds reaches better results.

Lan *et al.* (2003) informed that the supply of probiotic bacteria (*L. salivarius* and *L. agilis*) produce an increase of broilers liveweight. Other authors as Mohan *et al.* (1996), Zulkifli *et al.* (2000) and Balevi *et al.* (2001) also observed improvements in weight increase of the birds that were treated with probiotics.

Milián (2009) and Rondón (2009) evaluated the effect of different strains of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus salivarius* respectively, on productive indicators of broilers. These authors observed a better productive

El empleo de la mezcla de *L. salivarius* y *B. subtilis*, en la dieta de las aves representó mejora en todos los indicadores evaluados. El peso vivo al finalizar la crianza y la conversión en carne por cada kilogramo de alimento consumido, fue mejor con respecto a los animales que no recibieron esta mezcla microbiana.

Los indicadores evaluados en ambos grupos se encuentran por encima de los indicadores del instructivo técnico, empleado como criterio de comparación. Este supuso un control positivo en condiciones muy controladas para las instalaciones de la Unión de Empresas del Combinado Avícola Nacional (UECAN).

La viabilidad de las aves fue uno de los indicadores que se tuvo en cuenta entre los indicadores de salud durante la etapa experimental. En este caso, el mayor porcentaje de viabilidad correspondió a las aves tratadas con el biopreparado. El grupo de aves que no consumió la mezcla probiótica, no solo resultó con menor viabilidad, sino que, no logró alcanzar el porcentaje requerido por el estándar de la línea. Según Kizerwetter-Swida y Binek (2009), los microorganismos probióticos, al actuar, mantienen la microflora beneficiosa en el animal y excluyen aquellos microorganismos potencialmente patógenos. Esta presume ser la causa por la que el grupo de aves tratadas alcanza mejores resultados.

Lan *et al.* (2003) informaron que el suministro de bacterias probióticas (*L. salivarius* y *L. agilis*), producen incremento del peso vivo de las aves de engorde. Otros autores como Mohan *et al.* (1996), Zulkifli *et al.* (2000) y Balevi *et al.* (2001) también observaron mejoras en el incremento del peso de las aves que se trataron con probióticos.

Milián (2009) y Rondón (2009) evaluaron el efecto de diferentes cepas de *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus*

response in the treated animals regarding those of the control group. These results refers that probiotics, when stabilizing the microbiological system in the digestive tract, improve the nutrients digestibility and provide a range of higher absorption, when introducing an anabolism that promotes body weight gain with decreasing feed conversion.

Years later, a *Bacillus subtilis* E44 (subtilprobio) strains was evaluated in birds of heavy pure breeds E1 (González 2012) and, a *Lactobacillus salivarius* (Probiolactil) strain in birds of heavy pure breeds P8 (Suarez, 2013). As a result it was observed that the birds which ingested probiotic bacteria had better productive results than the control animals. This result agrees with those reached in this research, but in birds of heavy pure breeds B₄, treated with the mixture of probiotic strains previously mentioned.

These results could be related to the benefits provided by probiotic microorganisms when favoring digestion, absorption and nutrients use. The use of probiotics bio-preparation in broilers is a routine practice in modern poultry production which provides favorable results (Lima 2007) and coincides with those of this research.

A naturalistic and update approach of probiotics conceives them as natural products which are used as growth promoters in animals, so that its use allows to obtain higher yields, higher immune resistant, reduced or non amount of pathogens in the GIT and lower antibiotic residues and other substances in the final products.

The bio-preparation that was used in the experiment could influence in the improvement of liveweight, conversion, uniformity and the higher number of selected birds, according to the standard criteria.

salivarius respectivamente, en indicadores productivos de pollos de ceba. Estos autores observaron mejor respuesta productiva en los animales tratados con respecto a los del grupo control. Estos resultados refieren que los probióticos, al estabilizar el sistema microbiológico en el tracto digestivo, mejoran la digestibilidad de los nutrientes y proporcionan un rango de absorción más alto, al introducir un anabolismo que promueve la ganancia de peso corporal con la disminución de la conversión alimentaria.

Años más tarde, se evaluó en aves de líneas puras pesadas E1 (González 2012) cepas de *Bacillus subtilis* E44 (subtilprobio) y, en aves de líneas puras pesadas P8, una cepa de *Lactobacillus salivarius* (Probiolactil) (Suárez 2013). Como resultado se observó que las aves que ingirieron las bacterias probióticas tuvieron mejores resultados productivos que los animales controles. Este resultado coincide con los alcanzados en este trabajo, pero en aves de líneas puras pesadas B₄, tratadas con la mezcla de las cepas probióticas anteriormente mencionadas.

Estos resultados se pudieran relacionar con los beneficios que proporcionan los microorganismos probióticos al favorecer la digestión, la absorción y el aprovechamiento de nutrientes. El uso de biopreparados probióticos en pollos de ceba es una práctica de rutina en la producción avícola moderna que aporta resultados favorables (Lima 2007) y coincidentes con los de este trabajo.

Un enfoque naturalista y actualizado de los probióticos los concibe como productos naturales que se utilizan como promotores del crecimiento en los animales, de manera que su empleo permite obtener mayores rendimientos, resistencia inmunológica más elevada, reducida o ninguna cantidad de patógenos en el TGI y menores residuos de antibióticos u otras sustancias en los productos finales.

El biopreparado que se utilizó en el experimento pudo incidir en la mejora del peso vivo, la conversión, la uniformidad y la mayor cantidad de aves seleccionadas, según el criterio del estándar.

References

- Balevi, T., An, U.S., Coskun, B., Kurtoglu, V. & Etingul, I.S. 2001. Effect of dietary probiotic on performance and humoral immune response. *Brit. Poult. Sci.* 42:456-461
- Balzarini, M.G., Casanoves, F., Di Rienzo, J.A., González, L.A. & Robledo, C.W. 2001. INFOSTAT, Versión 1. Córdoba, Argentina.
- Brizuela, M. 2011. Desarrollo de productos probióticos y mezclas simbióticas para su empleo en alimentación y salud animal. In: Seminario Internacional de Sanidad Agropecuaria. 3-6 de mayo. Palacio de las Convenciones. Cuba.
- Carro, M. D., Saro, C., Mateos, I., Díaz, A. & Ranilla, M. J. 2014. Empleo de probióticos en la alimentación de rumiantes. *Editorial Agrícola Española S.A. Ganadería.* 93: 42 - 49.
- Duncan, B. 1955. Multiple ranges and multiple F. *Test Biometrics* 11:1.
- García, M., Sorrondegui, Y., López, Y., Carcassés, A. 2012. Empleo de probióticos en los animales. *Sitio argentino de Producción Animal.* Engormix.com. www.produccion-animal.com.a
- Gil de los Santos, J.R. & Gil-Turnes, C. 2005. Probióticos em avicultura. *iência Rural, Santa María* 35 (3): 741-747.
- González, E. O. 2012. Evaluación del SUBTILPROBIO en aves de líneas puras pesadas en la Unidad Genética Avícola de Torriente. *Eng. Thesis Universidad de Matanzas.* Cuba.
- González-Núñez D., Piad R. & Reyes-Sánchez Nadir. 2013. Comportamiento productivo de pollos de engorde suplementados con un pcl-glucano de producción nacional. *Revista Científica La Calera.* 13 (21): 82-87.
- Kizerwetter-Swida, M. & Binek M. 2009. Protective effect of potentially probiotic *Lactobacillus* strain on infection with pathogenic bacteria in chickens. *Pol. J. Vet. Sci.* 12:15
- Khaksefidi, A. & Ghoorchi, T. 2006. Effect of Probiotics on Performance and Immuno-competence in Broiler Chicks. *Journal*

- of Poultry Science, Vol 43: 296-300.
- Lan, P.T.N., Binh, L.T. & Benno, Y. 2003. Impact of two probiotic *Lactobacillus* strains feeding on faecal lactobacilli and weight gains in chicken. *The J. Gen. Appl. Microbiol.* 49 (1):29-36
- Lima, E.T., Andreatti Filho, R.L., Okamoto, A.S., Noujaim, J.C., Barros, M.R. & Crocci, A.J. 2007. Evaluation *in vitro* of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus spp.* isolated from chickens. *Canada J. Vet. Res.* 7(2):103-107.
- Milián, G. 2009. Obtención de cultivos de *Bacillus spp.* y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (*Gallusgallusdomesticus*). PhD.Thesis Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba.
- Milián, G., Rondón, A.J., Pérez, M., Samaniego, L.M., Riaño, J., Bocourt, 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 J. Agric. Sci.* 48:4
- Mohan, B., Kadirvel, R., Natarafan, A. & Bhaskaran, M. 1996. Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilization and serum cholesterol in broilers. *Braz. Poult. Sci.* 37:395-401.
- Mutus, R., Kocabagh, N., Alp, M., Acar, N., Eren, M. & Genzen, S. 2006. The effect of dietary probiotic supplementation on tibial bone characteristics in broilers. *Rev. Poultry Science* 85: 1621- 1625.
- Pérez, M., Laurencio, M., Rondón, J., Milian, G., Bocourt, R. & Arteaga, 2012. Evaluación de una mezcla probiótica en la alimentación de gallinas ponedoras en una unidad de producción comercial. *Pastos y Forrajes* 35 (3):311-320.
- Rondón, A. 2009. Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación integral de las respuestas de tipo probióticas provocadas en estos animales. PhD.Thesis. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba.
- Suárez, M. I. 2013. Evaluación a escala de producción del efecto probiótico del bio-preparado Probiolactil en pollos de inicio de reproductor pesado. Eng. Thesis. Universidad de Matanzas. Cuba.
- UCAN-IIA. 1998. Instructivo Técnico. Producción avícola. Pollos de engorde. Tecnología de crianza y regulaciones sanitarias generales, Cuba
- Zulkifli, I., Abdullah, N., Mohad, A.N. & Ho, Y. W. 2000. Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing *Lactobacillus* cultures and oxytetracycline under heat stress conditions. *Br. Poult. Sci.* 41:593-598.

Received: July 5, 2016