

Characterization of *Bacillus subtilis* strains as candidates for the preparation of animal additives

Caracterización de cepas *Bacillus subtilis* como candidatas para la elaboración de aditivos zootécnicos

Grethel Milián Florido¹, Ana J. Rondón¹, M. Pérez², R. Boucourt⁴, Marlen Rodríguez¹, Fátima Arteaga³, Yadileiny Portilla⁵, Y. Pérez¹, A. Beruvides¹, and Marta Laurencio¹

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

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

³Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Calceta, Ecuador

⁴Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

⁵Universidad Autónoma de Madrid, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049 Madrid, España

Email: grethel.milian@umcc.cu

The strains C-31, C-34 and E-44 of *Bacillus subtilis*, sub species *subtilis* were characterized for their use in the elaboration of animal additives destined for animal production. The studied strains belong to the strains collection from the Centro de Estudios Biotecnológicos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas and to the Instituto de Ciencia Animal. For the characterization of these strains, growth capacity, endospores production, enzyme production, antimicrobial activity and response to 25 broad spectrum antibiotics were considered. The results showed that the three strains have high growth capacity and endospore production, were able to inhibit Gram positive and Gram negative microorganisms; in addition to showing sensitivity to the 25 antibiotics evaluated. This allows inferring that these strains show favorable ranges to be used as animal additives, which are currently a promising alternative to the use of antibiotics as growth promoters.

Key words: antimicrobials, sensitivity, antibiotics, enzymes, *Bacillus subtilis*

Nowadays animal production is accompanied by an intensive practice that brings immunodepression in animals and predisposes them to gastrointestinal disorders, sometimes caused by the presence of pathogenic microorganisms (*Salmonella spp.*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*) (Hernández *et al.* 2015 and Rodríguez 2017), which have an impact on the low indexes shown by health indicators. Faced with this reality, worldwide, this situation is mitigated with the use of antibiotics as growth promoters (Pérez *et al.* 2015). However, the European Community prohibited its inclusion in the diet with prophylactic purposes (European Parliament and Council 2003). In this context, nutritionists and specialists initiated researches to search new animal additives that are innocuous for animals and humans, with similar effects to those drugs (Carro *et al.* 2014 and Linares 2015).

Se caracterizaron las cepas C-31, C-34 y E-44 de *Bacillus subtilis*, sub especie *subtilis* para su uso en la elaboración de aditivos zootécnicos destinados a la producción animal. Las cepas estudiadas pertenecen al Cepario del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas y al Instituto de Ciencia Animal. Para la caracterización de estas cepas se consideró la capacidad de crecimiento, producción de endosporas, producción de enzimas, actividad antimicrobiana y respuesta ante 25 antibióticos de amplio espectro. Los resultados mostraron que las tres cepas tienen alta capacidad de crecimiento y producción de endosporas, fueron capaces de inhibir microorganismos Gram positivos y Gram negativos; además de mostrar sensibilidad a los 25 antibióticos evaluados. Esto permite inferir que dichas cepas muestran rangos favorables para ser utilizadas como aditivos zootécnicos, que constituyen en la actualidad una alternativa prometedora ante el empleo de antibióticos como promotores del crecimiento.

Palabras clave: antimicrobianos, sensibilidad, antibióticos, enzimas, *Bacillus subtilis*

Hoy en día la producción animal va acompañada de una práctica intensiva que trae consigo inmunodepresión en los animales y los predispone a trastornos gastrointestinales, provocados en ocasiones por la presencia de microorganismos patógenos (*Salmonella spp.*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*) (Hernández *et al.* 2015 y Rodríguez 2017), que repercuten en los índices bajos que muestran los indicadores de salud. Ante esta realidad, a nivel mundial, se atenúa esta situación con el uso de los antibióticos como promotores del crecimiento (Pérez *et al.* 2015). Sin embargo, la Comunidad Europea prohibió su inclusión en la dieta con fines profilácticos (European Parliament and Council 2003). En este contexto, nutricionistas y especialistas iniciaron investigaciones para la búsqueda de nuevos aditivos zootécnicos que resultaran inocuos para los animales y el hombre, con efectos similares a estos fármacos (Carro *et al.* 2014 y Linares 2015).

Currently, it is working on the incorporation into animal production of additives made with endospores of *Bacillus spp.* that have probiotic activity due to their capacity to produce antimicrobial substances by bacteriocins and/or by antibiotics and enzymes (Kadaikunnan *et al.* 2015 and Kizerwetter-Świda and Binek 2016). Also its use is justified by its durability in production units.

Products produced from strains of *B. subtilis* and their endospores (BioPlus 2B®, Biostart®, Toyocerin®, Livalife®, Biosporin®, CenBiot®, Bactisubtil, Biosubtyl "Dalat" and Clostat®) are marketed in the world with probiotic effect on a wide category of livestock interest. However, the studies carried out with these products are not always reported, as regards the biochemical and microbiological characterization of the strains used in their preparation, which make them safe for their commercialization. The limited availability of studies for this purpose is a concern of the Food Agricultural Organization and World Health Organization (FAO and WHO 2012). Hence, the objective of this research is to characterize the strains C-31, C-34 and E-44 of *Bacillus subtilis*, sub species subtilis, as possible candidates to prepared animal additives that could be used in livestock production, as a viable and ecological alternative.

Materials and Methods

For the development of the research it was worked with the strains C-31, C-34 and E-44 of *Bacillus subtilis*, sub species subtilis, belonging to the strains collection from the Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas and to the Instituto de Ciencia Animal, isolated and identified by Milián *et al.* (2014).

a) Dynamics of the growth capacity and endospores production. Cultures in nutrient media were analyzed for 24-hour. Samples were taken at 0, 24, 48 and 72 h. Incubation was performed at 37 °C for 24 h under aerobiosis conditions. The count of microorganisms was by the number of colony forming units (CFU). It was determined according to the visual count of colonies on dishes with nutrient agar (Pelczar *et al.* 1966).

b) Determination of the antimicrobial activity. The technique diffusion of substances in agar was applied, according to the Barbosa *et al.* (2005) methodology. The indicator strains used are shown in table 1.

c) Determination of the sensitivity of the strains to antibiotics. The technique diffusion of antibiotic disc in agar was used, by Bauer *et al.* (1966). The antibiotics used and the concentration of the discs are described in table 2.

c) Determination of the specific enzymes production. It was carried out with the API-ZYM (BioMerieux SA, France) system.

Statistical processing. For the analysis of the growth capacity and sporulation data, the descriptive

Actualmente se trabaja en la incorporación en la producción animal de aditivos zootécnicos elaborados con endosporas de *Bacillus spp.* que poseen actividad probiótica por su capacidad para producir sustancias antimicrobianas por bacteriocinas y/o por antibióticos y enzimas (Kadaikunnan *et al.* 2015 y Kizerwetter-Świda y Binek 2016). También su uso se justifica por su durabilidad en unidades de producción.

En el mundo se comercializan productos elaborados a partir de cepas de *B. subtilis* y sus endosporas (BioPlus 2B®, Biostart®, Toyocerin®, Livalife®, Biosporin®, CenBiot®, Bactisubtil, Biosubtyl "Dalat" y Clostat®) con efecto probiótico en una amplia categoría de animales de interés zootécnico. Sin embargo, no siempre se informan los estudios realizados con estos productos, en lo que respecta a la caracterización bioquímica y microbiológica de las cepas que se utilizan en su elaboración, que los hacen seguros para su comercialización. La poca disponibilidad de trabajos con este fin constituye una preocupación de la Food Agricultural Organization y World Health Organization (FAO y WHO 2012). De ahí que el objetivo de esta investigación sea caracterizar las cepas C-31, C-34 y E-44 de *Bacillus subtilis*, sub especie subtilis, como posibles candidatas para elaborar aditivos zootécnicos que se pudieran utilizar en la producción pecuaria, como alternativa viable y ecológica.

Materiales y Métodos

Para el desarrollo de la investigación se trabajó con las cepas C-31, C-34 y E-44 de *Bacillus subtilis*, sub especie subtilis, pertenecientes al Cepario del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas y al Instituto de Ciencia Animal, aisladas e identificadas por Milián *et al.* (2014).

a) Dinámica de la capacidad de crecimiento y producción de endosporas. Se trabajó con cultivos de 24 h en caldo nutriente. La toma de muestras se hizo a las 0, 24, 48 y 72 h. La incubación se realizó a 37 °C durante 24 h en condiciones de aerobiosis. El conteo de microorganismos fue por el número de unidades formadoras de colonias (UFC). Se determinó según conteo visual de colonias en placas con agar nutriente (Pelczar *et al.* 1966).

b) Determinación de la actividad antimicrobiana. Se aplicó la técnica de difusión de sustancias en agar, según la metodología de Barbosa *et al.* (2005). Las cepas indicadoras utilizadas se muestran en la tabla 1.

c) Determinación de la sensibilidad de las cepas a antibióticos. Se utilizó la técnica de difusión de discos de antibióticos en agar, de Bauer *et al.* (1966). Los antibióticos utilizados y la concentración de los discos se describen en la tabla 2.

c) Determinación de la producción de enzimas específicas. Se realizó con el sistema API-ZYM (BioMerieux SA, France).

Procesamiento estadístico. Para el análisis de los datos de la capacidad de crecimiento y esporulación

Table 1. Indicator strains

WS	SMCs	SC- Esp	S- ATCC
<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lysteria inocua</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC-29737
Staphylococcus		<i>Lysteria monocytogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC-13047
Aerobacter		<i>E. coli</i> 0157-H7	Klebsiella ATCC-11296
Klebsiella			<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC-12228
Proteu			Proteus vulgaris ATCC-13315
			<i>Salmonella thyphimurium</i> ATCC- 14028

WS: wild strains, isolated from diseased and identified birds up to the taxonomic category of genus in the Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Aviar (LIDA) Matanzas, Cuba, SMCs: isolated strain of the cecal mucus of 42 day-old healthy broiler chickens (From the Banco de Cepas de la Universidad de Matanzas and the Instituto de Ciencia Animal, Cuba), SC- Esp: Cepario del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de León, España and S- ATCC: ATCC collection strain (American Type Culture Collection).

Table 2. Antibiotics used to check the sensitivity of strains to antimicrobials

Group	Antibiotics	Concentration (µg/disc)
Aminoglycosides	Kanamycin	100
	Amikacin	300
	Gentamicin	40
	Streptomycin	100
	Spectinomycin	200
	Apramycin	40
	Neomycin	120
Quinolones	Ciprofloxacin	0.5
	Enrofloxacin	10
	Nalidixan	10
Cephalosporins 1st and 3rd generation	Ceftiofur	30
	Cephalotin	66
Polypeptides	Polimycin	150
	Bacitracin	40
B-Lactamic	Penicillin	1
	Amoxicillin	30
	Ampicillin	33
Glycopeptides	Vancomycin	5
Lincosamidos	Clindamycin	25
	Lincomycin	19
Sulfonamides	Sulfadoxine	300
Chloraphenicol	Chloranphenicol	60
	Florfenicol	30
Macrolides	Erythromycin	78
	Novobiocin	30

statistics was applied. The mean, standard deviation and variation coefficient were determined. The statistical package used was INFOSTAT, version 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012). The CFU count data were transformed to Log N.

se aplicó la estadística descriptiva. Se determinó la media, desviación estándar y coeficiente de variación. El paquete estadístico utilizado fue INFOSTAT, versión 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012). Los datos del conteo de las UFC se transformaron a Log N.

Results and Discussion

Growth capacity and endospores production. Table 3 shows the descriptive results of the three strains (C-31, C-34 and E-44) in terms of the dynamics of microbial growth and endospores production. The characterization showed that the mean values of each of the strains oscillated between the ranges established for the *Bacillus spp.* genus According to studies conducted by Nguyen *et al.* (2015), the strains from this genus (*B. subtilis* and *B. licheniformis*) grow rapidly. The correlation with respect to the endospores production is more than 90%. These strains also have the ability to adapt to the conditions of the intestinal mucous of chickens.

Resultados y Discusión

Capacidad de crecimiento y producción de endosporas. En la tabla 3 se muestran los resultados descriptivos de las tres cepas (C-31, C-34 y E-44) en cuanto a la dinámica de crecimiento microbiano y producción de endosporas. La caracterización demostró que los valores medios de cada una de las cepas oscilan entre los rangos establecidos para el género *Bacillus spp.* Según estudios realizados por Nguyen *et al.* (2015), las cepas de este género (*B. subtilis* y *B. licheniformis*) crecen velozmente. La correlación con respecto a la producción de endosporas es de más de 90 %. Estas cepas poseen además, la capacidad para adaptarse a las condiciones de la mucosa intestinal de los pollos.

Table 3. Dynamics of the growth capacity and endospores production of the studied strains

Total count					
Treatments	C-31	C-34	E-44	SD	VC (%)
Hour 0	6.63 (4.26 E+6)	6.62 (4.14 E+6)	6.59 (3.93 E+6)	0.04	0.54
Hour 24	12.22 (1.66E+12)	12.22(1.77E+12)	12.26(1.81E+12)	0.32	0.27
Hour 48	12.21 (1.62E+12)	12.23(1.70E+12)	12.24(1.73E+12)	0.05	0.23
Hour 72	12.21 (1.63E+12)	12.20(1.59E+12)	12.21(1.61E+12)	0.08	0.19
Endospores counting					
Treatments	C-31	C-34	E-44	SD	VC (%)
Hour 0	1.52 (3.50 E+4)	1.19 (1.58 E+4)	1.12 (1.55 E+4)	1.00	3.17
Hour 24	11.14 (1.40E+11)	11.15(1.43E+11)	11.19(1.55E+11)	0.52	0.60
Hour 48	12.08 (1.20E+12)	12.06(1.16E+12)	12.07(1.16E+12)	0.05	0.30
Hour 72	12.20 (1.60E+12)	12.20(1.57E+12)	12.20(1.60E+12)	0.32	0.19

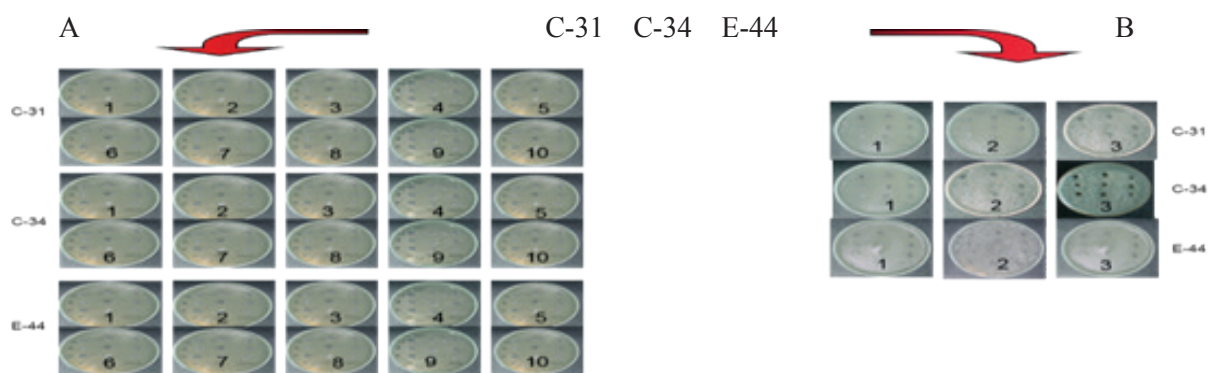
The results are the average of four determinations, () Original means, SD- Standard deviation; VC- Variation coefficient (%)

Determination of antimicrobial activity. In the sampling hours 0 and 6, there was not antimicrobial activity of the supernatants of the producing strains (C-31, C-34 and E-44) before the indicator strains. Figure 1 shows the results between 8 and 18 h. The three strains evaluated showed the ability to activate enzymes capable of producing antimicrobial substances for the total inhibition of *Aerobacter*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* 29737, *Klebsiella* 130300, *S. epidermidis* 12228 and *P. vulgaris*13315. However, for the strains of *E. coli* -0157-H7, *E. cloacae* and *S. typhimurium* no inhibition was observed by the producer strains. This response could be related to the fact that there were not antimicrobial substances to specifically inhibit these pathogens, despite the fact that *Bacillus spp.* produces a variety of classes and subclasses of bacteriocins and other inhibitory substances, capable of inhibiting a large group of pathogenic microorganisms.

The values reported by some authors (Nguyen *et al.* 2015 and Prado-Rebolledo *et al.* 2016), regarding the inhibition of pathogenic microorganisms with

Determinación de la actividad antimicrobiana. En las horas de muestreo 0 y 6 no se observó actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las cepas productoras (C-31, C-34 y E-44) ante las cepas indicadoras. En la figura 1 se muestran los resultados entre las 8 y 18 h. Las tres cepas evaluadas mostraron la capacidad de activar enzimas capaces de producir sustancias antimicrobianas para la inhibición total de *Aerobacter*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* 29737, *Klebsiella* 130300, *S. epidermidis* 12228 y *P. vulgaris*13315. Sin embargo, para las cepas de *E. coli* -0157-H7, *E. cloacae* y *S. typhimurium* no se observó inhibición por parte de las cepas productoras. Esta respuesta se pudiera relacionar con que no se encontraron sustancias antimicrobianas para inhibir específicamente a estos patógenos, a pesar de que se conoce que *Bacillus spp.* produce variedad de clases y subclasses de bacteriocinas y otras sustancias inhibitorias, capaces de inhibir un gran grupo de microorganismos patógenos.

Los valores informados por algunos autores (Nguyen *et al.* 2015 y Prado-Rebolledo *et al.* 2016), en cuanto a la inhibición de microorganismos patógenos con el uso



A: Inhibited strains: *Aerobacter* (1), *Staphylococcus* (2), *Klebsiella* (3), *Proteus* (4), *Listeria innocua* (5), *L. monocytogenes* (6), *S. aureus* 29737 (7), *Klebsiella* 130300 (8), *S. epidermidis* 12228 (9), *P. vulgaris* 13315 (10).
 B: Not inhibited strains: *E. coli*- 0157-H7 (1), *E. cloacae* 13047 (2), *S. thyphimurium* 14028 (3).

Figure 1. Antimicrobial response of the strains C-31, C-34 and E-44

the use of probiotics, are similar to those reported in this research.

Recent studies by Rodríguez (2017) shows that the *Bacillus* genus produces bacteriocin LFB 112 and lipopeptides Surfactin and Mycosubtilin, which inhibit the development of Gram positive and Gram negative bacteria, such as *E. coli*, *Salmonella*, *C. perfringens*, *Streptococcus spp.*, *S. aureus*, *Pasteurella multocida*, *P. aeruginosa*, germs involved in diseases of livestock interest. This makes promising the studied strains (C-31, C-34 and E-44).

Another reported result is the non-inhibition of *Lactobacillus salivarius* strains, which is an important element in current researches, because in recent years is working to obtain mixtures of microorganisms from different genus, with particular interest in *Lactobacillus* and *Bacillus*, with the purpose of enhancing probiotic activity in animals. These mixtures favor the persistence (useful life of the product) and provide a specific substrate for the resident bacterial biota, which theoretically favors the stabilization of the intestinal environment (Aziz-Mousavi *et al.* 2015)

Determination of sensitivity to antibiotics. Figure 2 shows that strains C-31, C-34 and E-44 are sensitive to the 25 evaluated antibiotics. It could be inferred that these strains do not have plasmids of resistance, an important element if it is taking into account that they can be valid for the elaboration of animal additives. This result agrees with Blajman *et al.* (2015), Nguyen *et al.* (2015) and Latorre *et al.* (2016) studies, developed with *Bacillus spp.* strains.

The results obtained in this research are in correspondence with what was proposed by the Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) and the Organización Mundial de la Salud (OMS), institutions that established not to use bacteria in foods that contain transferable genes with drug resistance. When selecting probiotic strains, they recommend that they do not

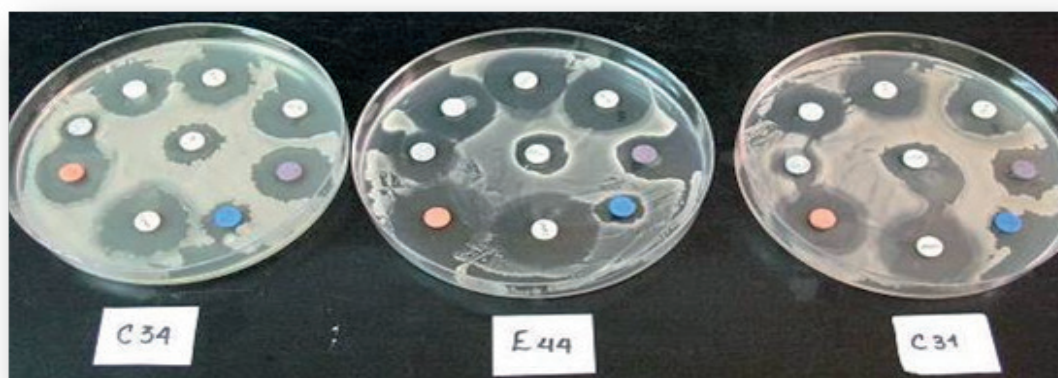
de probióticos, son análogos a los informados en esta investigación.

Trabajos recientes de Rodríguez (2017) revelan que el género *Bacillus* produce bacteriocina LFB 112 y lipopéptidos Surfactin y Mycosubtilin, que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas y Gram negativas, como *E. coli*, *Salmonella*, *C. perfringens*, *Streptococcus spp.*, *S. aureus*, *Pasteurella multocida*, *P. aeruginosa*, gérmenes involucrados en enfermedades propias de animales con interés zootécnico. Esto hace prometedoras a las cepas estudiadas (C-31, C-34 y E-44).

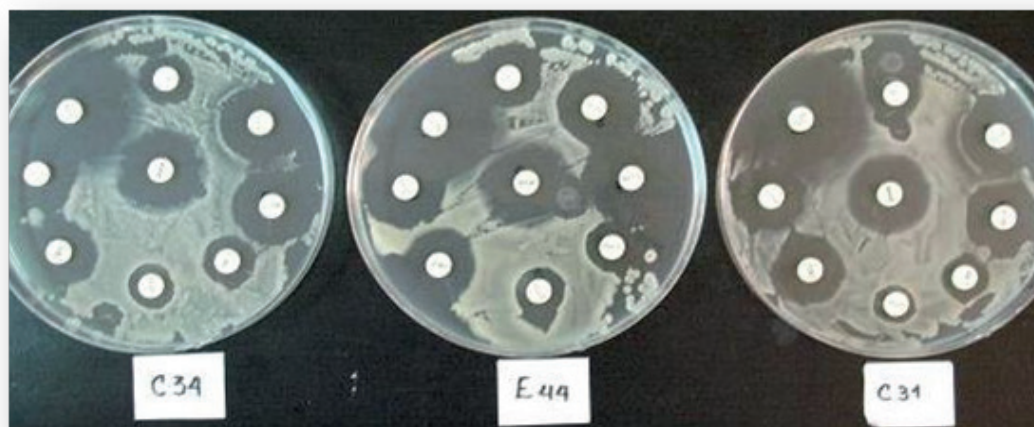
Otro resultado informado es la no inhibición de las cepas *Lactobacillus salivarius*, lo que constituye un elemento importante en las investigaciones actuales, debido a que en los últimos años se trabaja en la obtención de mezclas de microorganismos de diferentes géneros, con particular interés en *Lactobacillus* y *Bacillus*, con el propósito de potenciar la actividad probiótica en animales. Estas mezclas favorecen la persistencia (vida útil del producto) y proporcionan un sustrato específico para la biota bacteriana residente, lo que teóricamente favorece la estabilización del entorno intestinal (Aziz-Mousavi *et al.* 2015).

Determinación de la sensibilidad frente a antibióticos. La figura 2 muestra que las cepas C-31, C-34 y E-44 son sensibles a los 25 antibióticos evaluados. Se pudiera inferir que estas cepas no poseen plásmidos de resistencia, elemento importante si se tiene en cuenta que pueden ser válidas para la elaboración de aditivos zootécnicos. Este resultado concuerda con estudios de Blajman *et al.* (2015), Nguyen *et al.* (2015) y Latorre *et al.* (2016), desarrollados con cepas de *Bacillus spp.*

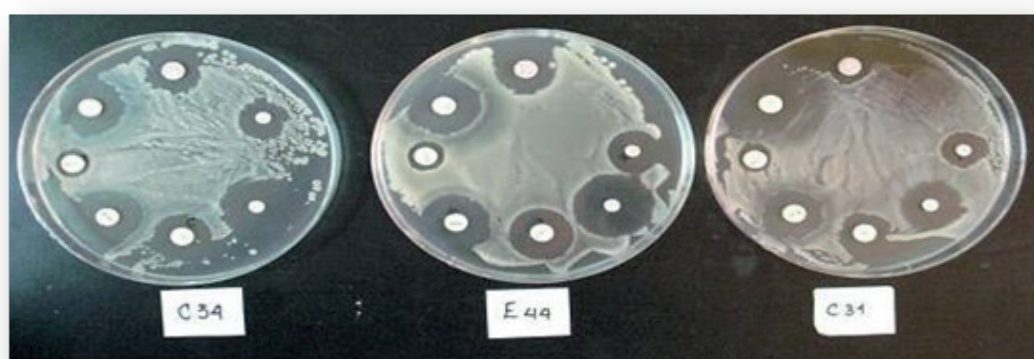
Los resultados obtenidos en esta investigación se encuentran en correspondencia con lo planteado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), instituciones que establecieron no utilizar bacterias en alimentos que contengan genes transferibles con resistencia a medicamentos. Cuando se proceda a la selección de cepas probióticas, recomiendan que estas no



Group 1



Group 2



Group 3

Figure 2. Sensitivity of the strains C-31, C-34 and E-44

have transmissible genes that codify for resistance to medicinal products used for clinical purposes (European Commission 2011).

Specific enzymes production. The results of the enzymatic activity of the strains are shown in table 4. Of the 19 substrates in the galleries, nine were used by the cells, which show that they have the ability to synthesize the specific enzymes for each of these substances. This makes possible its use in the elaboration of animal additives and their incorporation into the diet of animals, since they produce enzymes that are involved in the hydrolysis of different substances identified in the foods that are ingested, as well as remains of microbial cells or from the host, which favors the establishment

posean genes transmisibles que codifiquen la resistencia a medicamentos utilizados con fines clínicos (Comisión Europea 2011).

Producción de enzimas específicas. Los resultados de la actividad enzimática de las cepas se muestran en la tabla 4. De los 19 sustratos presentes en las galerías, nueve se utilizaron por las células, lo que demuestra que estas tienen la capacidad para sintetizar las enzimas específicas para cada una de estas sustancias. Ello posibilita su uso en la elaboración de aditivos zootécnicos y su incorporación a la dieta de animales, pues producen enzimas que intervienen en la hidrólisis de diferentes sustancias identificadas en los alimentos que se ingieren, así como restos de células microbianas o

of a balanced intestinal microbiota. In similar studies by Zhang *et al.* (2016) it is reported that when they evaluated a probiotic with strains of *Bacillus coagulans* NJ0516, they achieved an increase in the activity of the protease and amylase enzymes, which translated into improvements in the digestive processes in broiler chickens.

del hospedero, lo que favorece el establecimiento de una microbiota intestinal balanceada. En estudios similares de Zhang *et al.* (2016) se informa que cuando evaluaron un probiótico con cepas de *Bacillus coagulans* NJ0516, lograron incremento en la actividad de las enzimas proteasas y amilasas, lo que se tradujo en mejoras en los procesos digestivos en pollos de ceba.

Table 4. Enzymatic profile of the strains C-31, C-34 and E-44 of *Bacillus subtilis*

Substrate concentration	Enzyme	Treatments		
		C-31	C-34	E-44
Control	Control	0	0	0
2-naphthyl phosphate	Alkaline phosphatase	5	5	5
2- naphthyl butyrate	Esterase (C 4)	5	5	5
2- naphthyl caprylate	Esterase Lipase (C8)	5	5	5
2- naphthyl myristate	Lipase (C14)	3	3	3
L-leucyl-2-naphthylamide	Leucine arylamidase	2	2	2
L-valyl-2-naphthylamide	Valine arylamidase	0	0	0
L-cystyl-2-naphthylamide	Cystine arylamidase	0	0	0
N-benzoyl-DL-arginine-2naphthylamide	Trypsin	0	0	0
N-glutaryl-phenylalanine-2naphthylamide	α -Chimotrypsin	0	0	0
2-naphthyl-phosphate	Acid phosphatase	3	3	3
Naphthol-AS-BI-phosphate	Naphthol-A-S-BI phosphohydrolase	4	4	4
6-Br-2-naphthyl- b D-galactopyranoside	α –galactosidase	0	0	0
2-naphthyl- b D-galactopyranoside	β -galactosidase	0	0	0
Naphthol-AS-BI- bD-glucuronide	β -glucuronidase	0	0	0
2-naphthyl-aD-glucopyranoside	α -glucosidase	4	4	4
6-BR-2-naphthyl-bD-glucopyranoside	β -glucosidase	5	5	5
1-naphthyl-N-acetyl-bD-glucosaminide	N-acetyl- β -glucosaminidase	0	0	0
6-BR-2-naphthyl-aD-mannopyranoside	α -mannosidase	0	0	0
2-naphthyl-aL-fucopyranoside	α -fucosidase	0	0	0

The numerical values are color intensity ranges in the Test, ranging from 0 (-) (negative reaction) to 5 (maximum activity).

biotics

As a result of the characterization study of the strains C-31, C-34 and E-44, identified as *Bacillus subtilis*, sub species subtilis, it is possible to conclude that the strains show potential characteristics for their use in the elaboration of animal additives with possible probiotic effect on livestock interest.

Como resultado del estudio de caracterización de las cepas C-31, C-34 y E-44, identificadas como *Bacillus subtilis*, sub especie subtilis, permite concluir que las cepas muestran características potenciales para su utilización en la elaboración de aditivos zootécnicos con posible efecto probiótico en animales de interés zootécnico.

References

- Aziz-Mousavi, S. M. A., Seidavi, A., Dadashbeiki, M., Kilonzo, K., Nahashon, S., Laudadio, V. & Tufarelli, V. 2015. "Effect of a synbiotic (Biomin®IMBO) on growth performance traits of broiler chickens". European Poultry Science, 79: 1–15, ISSN: 1612-9199, DOI: 10.1399/eps.2015.78.
- Barbosa, T. M., Serra, C. R., Ragione, R. M. L., Woodward, M. J. & Henriques, A. O. 2005. "Screening for Bacillus Isolates in the Broiler Gastrointestinal Tract". Applied and Environmental Microbiology, 71(2): 968–978, ISSN: 0099-2240, 1098-5336, DOI: 10.1128/AEM.71.2.968-978.2005.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. & Turck, M. 1966. "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method". American Journal of Clinical Pathology, 45(4): 493–496, ISSN: 0002-9173.
- Blajman, J. E., Zbrun, M. V., Astesana, D. M., Berisvil, A. P., Romero, A. S., Fusari, M. L., Soto, L. P., Signorini, M. L., Rosmini, M. R. & Frizzo, L. S. 2015. "Probiotics in broilers rearing: A strategy for intensive production models". Revista Argentina de microbiología, 47(4): 360–367, ISSN: 0325-7541, DOI: 10.1016/j.ram.2015.08.002.
- Carro, T. M. D., Saro, H. C., Mateos, Á. I., Díaz, R. A. & Ranilla, G. M. J. 2014. "Perspectivas y retos de los extractos vegetales

- como aditivos alimentarios en rumiantes”. Albéitar, (179): 4–6, ISSN: 1699-7883.
- Comisión Europea 2011. Plan de acción contra la amenaza creciente de las resistencias bacterianas. Unión Europea: Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo y al Consejo, Available: <http://ec.europa.eu/dgs/health_food_safety/docs/communication_amr_2011_748_es>, [Consulted: November 1, 2017].
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2012. InfoStat. version 2012, [Windows], Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, Available: <<http://www.infostat.com.ar/>>.
- European Parliament and Council 2003. Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22nd September 2003 on additives for use in animal nutrition. no. L268/36, European Union: FAO, FAOLEX, Available: <[http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:omZ256twD-oJ:https://www.ecolex.org/details/legislation/regulation-ec-no-18312003-of-the-european-parliament-and-of-the-council-on-additives-for-use-in-animal-nutrition-lex-faoc040306/%2BRegulation+\(EC\)+No.+1831/2003+of+the+European+Parliament+and+of+the+Council+of+22nd+September+2003+on+additives+for+use+in+animal+nutrition&client=firefox-b-ab&hl=es&ct=clnk](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:omZ256twD-oJ:https://www.ecolex.org/details/legislation/regulation-ec-no-18312003-of-the-european-parliament-and-of-the-council-on-additives-for-use-in-animal-nutrition-lex-faoc040306/%2BRegulation+(EC)+No.+1831/2003+of+the+European+Parliament+and+of+the+Council+of+22nd+September+2003+on+additives+for+use+in+animal+nutrition&client=firefox-b-ab&hl=es&ct=clnk)>, [Consulted: October 12, 2017].
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) & WHO (World Health Organization) 2012. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Ontario, Canada, Available: <http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>, [Consulted: October 12, 2017].
- Hernández, A. H., Coronel, C. R., Monge, M. Z. & Quintana, C. H. 2015. “Microbiota, Probióticos, Prebióticos y Simbióticos”. Revista Pediatría Integral, 19(5): 337–354, ISSN: 1135-4542.
- Kadaikunnan, S., Rejiniemon, T. S., Khaled, J. M., Alharbi, N. S. & Mothana, R. 2015. “In-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of *Bacillus amyloliquefaciens*”. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 14: 9, ISSN: 1476-0711, DOI: 10.1186/s12941-015-0069-1.
- 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, ISSN: 2300-2557, DOI: 10.1515/pjvs-2016-0003.
- Latorre, J. D., Hernandez-Velasco, X., Wolfenden, R. E., Vicente, J. L., Wolfenden, A. D., Menconi, A., Bielke, L. R., Hargis, B. M. & Tellez, G. 2016. “Evaluation and Selection of Bacillus Species Based on Enzyme Production, Antimicrobial Activity, and Biofilm Synthesis as Direct-Fed Microbial Candidates for Poultry”. Frontiers in Veterinary Science, 3, ISSN: 2297-1769, DOI: 10.3389/fvets.2016.00095, Available: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5071321/>>, [Consulted: November 1, 2017].
- Linares, L. 2015. “Los desafíos nutricionales frente a las restricciones de uso de aditivos: eliminación de uso de antibiótico”. In: XXIV Congreso Latinoamericano de Avicultura 2015, Guayaquil, Ecuador: Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador (CONAVE), Available: <<https://www.engormix.com/avicultura/articulos/los-desafios-nutricionales-frente-t32625.htm>>, [Consulted: November 1, 2017].
- Milián, G., Rondón, A. J., Pérez, M., Samaniego, L. M., Riaño, J., Bocourt, R., Ranilla, R., Carro, M. D., Rodríguez, M. & Laurencio, M. 2014. “Isolation and identification of strains of *Bacillus spp.* in different ecosystems, with probiotic purposes, and their use in animals”. Cuban Journal of Agricultural Science, 48(4): 347–351, ISSN: 2079-3480.
- Nguyen, A. T. V., Nguyen, D. V., Tran, M. T., Nguyen, L. T., Nguyen, A. H. & Phan, T.-N. 2015. “Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* CH16 strain from chicken gastrointestinal tracts for use as a feed supplement to promote weight gain in broilers”. Letters in Applied Microbiology, 60(6): 580–588, ISSN: 1472-765X, DOI: 10.1111/lam.12411.
- Pelczar, M. J., Reid, R. D. & Aguilar-Bartolomé, F. 1966. Microbiología. México: McGraw-Hill, 664 p.
- Pérez, Q. M., Milian, F. G., Rondón, A. J., Bocourt, S. R. & Torres, V. 2015. “Efecto de endosporas de *Bacillus subtilis* E-44 con actividad probiótica sobre indicadores fermentativos en órganos digestivos e inmunológicos de pollos de engorde”. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 35(2): 89–94, ISSN: 1315-2556.
- Prado-Rebolledo, O. F., Delgado-Machuca, J. de J., Macedo-Barragan, R. J., Garcia-Márquez, L. J., Morales-Barrera, J. E., Latorre, J. D., Hernandez-Velasco, X. & Tellez, G. 2016. “Evaluation of a selected lactic acid bacteria-based probiotic on *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization and intestinal permeability in broiler chickens”. Avian Pathology, 46(1): 90–94, ISSN: 0307-9457, DOI: 10.1080/03079457.2016.1222808.
- Rodríguez, M. 2017. Evaluación de la capacidad antibacteriana de PROBIOLEV® frente a bacterias patógenas. Ph.D. Thesis, Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba, 100 p.
- Zhang, L., Zhang, L., Zhan, X., Zeng, X., Zhou, L., Cao, G., Chen, A. & Yang, C. 2016. “Effects of dietary supplementation of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune response, intestinal barrier function, and digestive enzyme activity in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88”. Journal of Animal Science and Biotechnology, 7: 3, ISSN: 2049-1891, DOI: 10.1186/s40104-016-0061-4.

Received: February 24, 2017