



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

Facultad de Ciencias
Programa Maestría en Microbiología
(Modalidad profundización)

**Perspectiva del uso del género *Bacillus* spp como
suplemento probiótico en pollos de engorde para modular
la microbiota intestinal: una revisión sistemática**

Luis Guillermo Zambrano Fuentes

Bogotá D.C., Colombia
Marzo, 2023

Perspectiva del uso del género *Bacillus* spp como suplemento probiótico en pollos de engorde para modular la microbiota intestinal: una revisión sistemática

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de

Magíster en Microbiología
(Modalidad de Profundización)

Luis Guillermo Zambrano Fuentes

Bacteriólogo y Laboratorista Clínico
Énfasis en Diagnóstico Veterinario

Directora

Ligia Consuelo Sánchez Leal

Magister en Educación
Magister en Biología Aplicada
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Línea de Investigación:
Salud y Desarrollo Humano
Grupo de Investigación CEPARIUM

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias
Programa de Maestría en Microbiología
Bogotá D.C., Colombia
Marzo, 2023

Dedicatoria

*Dedico mi tesis a Dios,
por darme la fuerza necesaria para culminar esta meta.*

*A mi madre, por todo su amor y por motivarme a seguir hacia adelante.
Con su bendición a diario me protege y me lleva por el camino correcto.*

Agradecimientos

Infinitas gracias a Dios por haberme dado la sabiduría y entendimiento para poder llegar al final de esta meta, por proveerme de fortaleza y ser mi guía en este camino.

A mi madre mil gracias por el apoyo incondicional que me ha brindado durante toda mi vida, por su comprensión y paciencia en los momentos difíciles.

A mis hermanas y sobrinos por todo el apoyo y cariño brindado.

A mi pareja por su cariño y apoyo durante esta última fase de este proceso.

A la profesora Ligia Consuelo Sánchez Leal, por su dedicación y paciencia, sin sus palabras y correcciones precisas no hubiese podido lograr llegar a este punto tan anhelado.

De igual manera mis agradecimientos a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, a toda la Facultad de Ciencias de la Salud, a mis profesores en especial a la profesora Ligia Consuelo Sánchez Leal y profesora Paola Santos, quienes con la enseñanza de sus valiosos conocimientos hicieron que pueda crecer día a día como profesional, gracias a cada una de ustedes por su paciencia, dedicación, apoyo incondicional y amistad.

Contenido

Lista de figuras.....	VI
Lista de tablas.....	VII
Lista de abreviaturas.....	VIII
Resumen.....	IX
Abstract.....	X
1. Introducción.....	1
1.1 Justificación.....	4
2. Objetivos.....	7
2.1 Objetivo general.....	7
2.2 Objetivos específicos.....	7
3. Marco normativo.....	8
4. Marco de referencia.....	11
4.1 Probióticos, generalidades.....	11
4.1.1 Importancia de los probióticos.....	11
4.1.2 Criterios para que un microorganismo sea considerado probiótico.....	12
4.1.3 Mecanismo de acción de los probióticos.....	13
4.1.4 Microorganismos utilizados como probióticos.....	13
4.2 Industrias que producen probióticos.....	15
4.2.1 Efectos de los probióticos en el rendimiento productivo.....	15
4.2.2 Sectores donde se aplican los probióticos.....	16
4.3 <i>Bacillus</i> spp, características.....	16
4.3.1 Aplicación de <i>Bacillus</i> spp en diferentes sectores.....	18
4.3.2 <i>Bacillus</i> spp: patógeno o probiótico.....	19
4.4 Modulación de la microbiota intestinal.....	20
4.4.1 Tracto gastrointestinal de las aves - TGI.....	21
4.4.2 Pollos de engorde, generalidades.....	23
4.4.3 Enfermedades que afectan a los pollos de engorde.....	25
5. Diseño metodológico.....	26
5.1 Criterios de inclusión.....	26
5.2 Criterios de exclusión.....	27
6. Resultados y discusión.....	29
7. Conclusiones.....	48
8. Recomendaciones.....	49
Referencias.....	50

Lista de figuras

Figura 1. Principales mecanismos de acción de los probióticos.....	13
Figura 2. Microorganismos utilizados como probióticos.	14
Figura 3. Colonia en agar sangre y coloración de Gram de <i>Bacillus subtilis</i>	17
Figura 4. Taxonomía del género <i>Bacillus</i> spp 17	17
Figura 5. Aplicaciones de <i>Bacillus</i> spp en diferentes sectores.....	19
Figura 6. Microbiota intestinal del pollo de engorde.....	20
Figura 7. Cambios espaciales de la microbiota intestinal de las aves.....	22
Figura 8. Pollo Cobb 500.....	23
Figura 9. Pollo de engorde línea Cobb 24	24
Figura 10. Hembra reproductora Hubbard F15 y macho Hubbard M77 24	24
Figura 11. Esquema de la metodología utilizada. 28	28
Figura 12. Diagrama de flujo del proceso de identificación y selección de textos incluidos en la revisión sistémica periodo entre 2000 a 2010. 29	29
Figura 13. Diagrama de flujo del proceso de identificación y selección de textos incluidos en la revisión sistémica periodo entre 2011 a 2021. 30	30
Figura 14. Aplicación del diseño metodológico..... 35	35
Figura 15. Comparación de publicaciones por continentes entre los dos períodos..... 36	36
Figura 16. Número de publicaciones por año..... 37	37
Figura 17. Tipo de publicación incluida en el estudio..... 37	37
Figura 18. Frecuencia especies <i>Bacillus</i> spp..... 40	40
Figura 19. Pollo Ross 308AP..... 43	43
Figura 20. Mecanismos de acción de <i>Bacillus</i> spp..... 44	44
Figura 21. Mecanismo exclusión por competitividad. 44	44
Figura 22. Mecanismo para reducir compuestos tóxicos..... 45	45
Figura 23. Mecanismo de inmunomodulación..... 45	45
Figura 24. Mecanismo para mejorar la digestión..... 46	46

Lista de tablas

Tabla 1. Beneficios de los probióticos	12
Tabla 2. Microorganismos usados como probióticos.	14
Tabla 3. Empresas que producen probióticos.	15
Tabla 4. Enfermedades de importancia en pollos de engorde.....	25
Tabla 5. Búsqueda por correlación preliminar entre palabras claves y periodo de publicación 2000 – 2010.	31
Tabla 6. Búsqueda por correlación preliminar entre palabras clave y periodo de publicación 2011 – 2021.	31
Tabla 7. Búsqueda por correlación preliminar entre revisión de títulos 2000 – 2010.....	32
Tabla 8. Búsqueda por correlación preliminar entre revisión de títulos 2011– 2021.....	32
Tabla 9. Estrategia de búsqueda sistemática en bases de datos.....	32
Tabla 10. Búsqueda mediante estrategia de búsqueda avanzada durante el periodo 2000 – 2010.	34
Tabla 11. Búsqueda mediante estrategia de búsqueda avanzada durante el periodo 2011 – 2021.	34
Tabla 12. Especies de <i>Bacillus</i> spp utilizadas como probiótico en la avicultura.	39
Tabla 13. Características de algunas especies de <i>Bacillus</i> spp	39

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
BA*	Amina biogénica
BLIS*	Sustancias inhibidoras similares a las bacteriocinas
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
CONPES	Consejo Nacional de Política Económica y Social
CAGR*	Tasa de crecimiento anual compuesto
DFM*	Microorganismos de Alimentación Directa
EE.UU	Estados Unidos
EFSA*	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
FAO*	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA*	Administración de Alimentos y Medicamentos
FENAVI	Federación Nacional de Avicultores
FIRA	Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura
FSIS*	Servicio de Seguridad e Inspección Alimentaria
GALT*	Tejido linfoide asociado al intestino
GRAS*	Generalmente reconocido como seguro
MI	Microbiota Intestinal
OIE*	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
Sb	<i>Saccharomyces boulardii</i>
SE	<i>Salmonella enteritidis</i>
SIVIGILA	Sistema de Vigilancia en Salud Pública
TGI	Tracto gastrointestinal
UNICEF*	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia
USDA*	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

***Abreviatura del inglés**

Resumen

La importancia que ha tomado el conocimiento sobre la microbiota intestinal por el rol que ha demostrado tener en los procesos de salud y enfermedad de los seres vivos, ha llevado a plantear alternativas con nuevos microorganismos que mantengan en condiciones de equilibrio la función intestinal, con el fin de garantizar un buen estado de salud y en el caso de animales de cría para consumo humano, un desarrollo adecuado que represente aumento de ganancias económicas.

El tracto gastrointestinal de los pollos de engorde alberga una diversidad de microorganismos que le permiten procesar los alimentos que consumen para obtener los nutrientes necesarios para su crecimiento. Cuando esa armonía se ve interrumpida por diversos factores como ambientales, la alimentación o la edad, es necesario iniciar una pronta recuperación para que el animal no se vea afectado. En los esfuerzos por buscar una alternativa acorde con los avances científicos, se han estado incorporando varios microorganismos con características de probióticos que puedan ser utilizados para la modulación de la microbiota intestinal. Existe una amplia variedad de microorganismos con actividad probiótica, entre las cuales se encuentran algunas especies del género *Bacillus* spp., que incluso ya se producen a nivel comercial. Como cualquier producto que se use en la cadena alimenticia en la que el consumidor final es el hombre, es necesario que se garantice su inocuidad al utilizarlo como probiótico, en particular considerando que algunas especies como *B. subtilis* y *B. licheniformis* se pueden comportar como microorganismos patógenos en humanos inmunocomprometidos.

En esta revisión se abordan investigaciones en donde se ha encontrado al género *Bacillus* spp, utilizado como probiótico y se describen los beneficios que existen al ser consumido por los pollos y el efecto en los consumidores. Lo anterior, permitirá realizar un análisis de las perspectivas que tiene este género en la producción de probióticos.

Palabras clave: *Bacillus*, probióticos, pollos de engorde, microbiota intestinal, inmunomodulación.

Abstract

The importance that knowledge of the intestinal microbiota has taken on due to the role it has been shown to play in the health and disease processes of living beings, has led to the development of alternatives with new microorganisms that maintain intestinal function in balanced conditions, with the aim of guaranteeing a good state of health and, in the case of animals raised for human consumption, adequate development that represents an increase in economic profits.

The gastrointestinal tract of broilers harbors a diversity of microorganisms that allow them to process the food they eat to obtain the nutrients necessary for growth. When this harmony is interrupted by various factors such as environmental factors, feed or age, it is necessary to initiate a prompt recovery so that the animal is not affected. In the efforts to find an alternative in accordance with scientific advances, several microorganisms with probiotic characteristics have been incorporated that can be used for the modulation of the intestinal microbiota. There is a wide variety of microorganisms with probiotic activity, among which are some species of the genus *Bacillus* spp. that are already commercially produced. Like any product used in the food chain in which the final consumer is the human being, it is necessary to guarantee its safety when used as a probiotic, particularly considering that some species such as *B. subtilis* and *B. licheniformis* can behave as pathogenic microorganisms in immunocompromised humans. This review addresses research where the genus *Bacillus* spp. has been found to be used as a probiotic and describes the benefits that exist when consumed by chickens and the effect on consumers. This will allow an analysis of the perspectives of this genus in the production of probiotics.

In this review, research is addressed where the genus *Bacillus* spp. has been found to be used as a probiotic and describes the benefits that exist when consumed by chickens and the effect on consumers. This will allow an analysis of the different perspectives that this genus has in the production of probiotics.

Keywords: *Bacillus*, probiotics, broilers chickens, gut microbiota, immunomodulation.

1. Introducción

El mundo se encuentra en una época de modernización, y con esto, no solo se refiere exclusivamente a los avances que se han presentado tecnológicamente, sino en todos los sectores. El ser humano está frente a un nuevo mundo que le exige cada vez más y eso implica tomar conciencia de su salud y del entorno en el que vive. La producción a escala industrial de diferentes productos, principalmente alimenticios para satisfacer las demandas del mercado, ha hecho que busque alternativas más saludables que lo beneficien a él y al resto de seres vivos que lo rodean, entre las que se encuentran los probióticos (1).

El término probiótico, se refiere a aquellos microorganismos que suministrados en las proporciones adecuadas brindan una serie de beneficios al individuo que se les administra (2,3). Estos microorganismos para ser utilizados como suplementos probióticos, de acuerdo a las recomendaciones dada por el grupo de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por su sigla en inglés) (4), deben cumplir una serie de requisitos como: i) el microorganismo debe llegar a su sitio de acción, el cual es generalmente el tracto gastrointestinal y ser capaz de sobrevivir al estrés fisiológico que se encuentra durante su ingestión como es el ácido estomacal y pH intestinal, entre otras condiciones; ii), su consumo no debe presentar ningún riesgo para el huésped, por esto, el microorganismo a utilizar no debe tener probabilidades de convertirse en patógeno; iii), debe mantenerse viable en la presentación en la que comercialice (4). Los probióticos se han utilizado en humanos y también en animales (1).

El sector avícola en años recientes ha ganado una amplia importancia, debido a que, el consumo de productos derivados de aves ha presentado un aumento significativo, convirtiéndola en el segundo tipo de carne más consumida a nivel mundial (5). Una de las mayores producciones dentro de este sector es la de pollos de engorde, ya que, este tipo de pollo se cría única y exclusivamente para la obtención de la carne. Según datos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), en ese país, la producción de pollos de engorde en el 2020 fue de 9,22 mil millones,

representando más del 20% de la producción avícola, seguido por Brasil, la Unión Europea y China.

En Colombia, según *Statista Research Department*, en 2021, la producción de carne de pollo en Colombia ascendió a 1,64 millones de toneladas métricas, frente a los 1,69 millones de toneladas métricas producidas en el 2020. Para 2022, se espera que la producción presente un leve aumento, alcanzando los 1,68 millones de toneladas (6). En la figura 1 se presenta la producción de carne de pollo en Colombia de 2010 a 2022 (en millones de toneladas métricas), observando el comportamiento que se ha presentado en los últimos 12 años respecto a la producción de este tipo de carne.

El uso de antimicrobianos en la producción avícola ha estado acompañado de varios impactos que afectan a las aves como: el surgimiento de patógenos resistentes a antimicrobianos y a la disbiosis de la microbiota intestinal, que termina afectando a las bacterias benéficas del tracto gastrointestinal de las aves y dan paso a las bacterias perjudiciales. Los probióticos en este sector han demostrado tener un efecto positivo en la modulación de la estructura anatómica del intestino y de la microbiota intestinal, a través de diferentes mecanismos como mayor incremento de microvellosidades y protección frente a microorganismos invasores, lo que termina beneficiando al ave (7).

En recientes estudios sobre la microbiota intestinal se ha determinado que una perturbación en el equilibrio de la comunidad microbiana que la conforma está relacionada con diferentes alteraciones a nivel intestinal y extraintestinal. La integridad del tracto gastrointestinal y de la microbiota que ahí se encuentra desempeña un rol importante en la absorción de nutrientes, protección frente a patógenos y maduración del tubo digestivo (8).

En la alimentación de pollos de engorde, las especies probióticas pertenecientes a los géneros bacterianos *Streptococcus* spp, , *Bacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Enterococcus* spp, *Lactobacillus* spp, hongos como *Aspergillus* spp, *Saccharomyces* spp y *Candida* spp (9) tienen un efecto positivo sobre el rendimiento productivo o índice de peso corporal, entre los cuales se pueden destacar la modulación de la microbiota intestinal (MI), mejoramiento de la calidad de la carne, maduración del epitelio intestinal e inmunomodulación. Algunas especies del género *Bacillus* spp como *B. subtilis* y *B. licheniformis* se pueden comportar como patógenas y es

importante no olvidar que cualquier microorganismo que se use puede representar un comportamiento inesperado en caso de que cambie la condición en la cual se agrega al producto.

La presente revisión busca mostrar el comportamiento del género *Bacillus* spp en la aplicación como suplemento probiótico en la producción de pollos de engorde, buscando una profundización de la etiología y su fisiología de *Bacillus* spp en el ave, con el objetivo de determinar su acción en la regulación de la microbiota intestinal, así como las repercusiones que puede tener este género en la salud humana.

Para el desarrollo de la presente revisión, se realizó una investigación en diferentes bases de datos de literatura académica, apoyada en una metodología con un componente cualitativo. La búsqueda planteada se limitó con la selección de textos en dos períodos, entre el año 2000 al año 2010, y entre el año 2011 al 2021 con el fin de observar la importancia que presenta el tema entre investigadores.

Planteamiento del problema

El sector de la avicultura a nivel mundial ha presentado un crecimiento acelerado, lo cual incluye a los sistemas avícolas familiares, pequeña escala. Lo anterior, ha llevado a que las personas que se dedican a esta industria hagan uso de productos químicos como antimicrobianos y promotores de crecimiento, que tienen como fin acelerar el desarrollo del pollo, lograr un mejor factor de conversión alimenticia y prevenir enfermedades ignorando las consecuencias al usar estos productos específicamente los antimicrobianos.

Los antimicrobianos en el sector de la avicultura se han utilizado hace más de seis décadas, pero su uso indiscriminado en los últimos años ha favorecido el surgimiento de bacterias multirresistentes y la alteración de la microbiota intestinal de las aves (10).

Por otra parte, se ha demostrado que el uso de antimicrobianos tiene diferentes impactos para el ave, el ser humano y el medio ambiente. En el caso de las aves, pueden provocar una disbiosis a nivel intestinal lo que las hace propensas a infecciones por enteropatógenos. Para el consumidor, se ha evidenciado residuos de antimicrobianos en productos avícolas, como las tetraciclinas, las cuales pueden

provocar hipoplasia del esmalte dental. Y para el medio ambiente, los residuos de antimicrobianos contribuyen al desarrollo y diseminación de bacterias que se encuentren en sistema acuáticos o terrestres y a la resistencia de microorganismos que viven en estos ambientes.

Por lo anterior, la necesidad de buscar alternativas efectivas que favorezcan al ave, al ser humano y al medio ambiente es un reto que tiene la comunidad científica, por esta razón, el estudio de microorganismos benéficos que han demostrado actividad probiótica ha aumentado en los últimos años, debido a que se pueden utilizar con el objetivo de reemplazar o minimizar el uso y efectos negativos de estos productos.

El trabajo realizado en conjunto entre la medicina humana, medicina veterinaria, profesionales de economía y ciencias biológicas ha permitido que se realice un análisis de las repercusiones que puede traer a la salud pública el uso indiscriminado de estos productos. Por lo anterior, surge la necesidad de realizar una revisión científica exhaustiva que permita determinar los microorganismos que puedan ser utilizados como probióticos en la producción de pollo de engorde y que representen total inocuidad para el hombre y las aves.

Por lo anterior, se propuso como pregunta orientadora para el desarrollo de este trabajo de grado ¿Cuáles son los efectos que podría tener el uso de probióticos elaborados con bacterias del género *Bacillus* spp al ser utilizado como suplemento alimenticio en la producción de pollos de engorde?

1.1 Justificación

Las Buenas Prácticas Avícolas (BPAV) son un conjunto de medidas que buscan garantizar a través de su implementación la inocuidad alimentaria, la sanidad y manejo animal, la seguridad de los avicultores y la salud del medio ambiente, con el fin de obtener una producción avícola que cumpla exigencias de los mercados nacionales e internacionales, se hace necesario la búsqueda de alternativas que permitan cumplir ese objetivo.

A nivel mundial, la avicultura está consolidando su fortaleza exportadora, debido a que se ha convertido en una fuente de consumo primordial en algunos países. En Colombia, la producción de carne de pollo ha presentado un crecimiento significativo.

Las estadísticas de Federación Nacional de Avicultores de Colombia, FENAVI, indican que, entre el período comprendido entre enero a agosto de 2020, la producción de carne de pollo ascendió a 1.040.660 toneladas (11).

El consumo per cápita mundial en promedio es de 14.2 kilogramos de carne de pollo por persona al año (12). En Colombia, según datos de aviNews, el consumo per cápita de pollo en el 2022 alcanzó los 36,3 kilos por habitante (13).

Por lo anterior, abrir las perspectivas de investigación con microorganismos benéficos es una de las alternativas amigables que el mundo científico está procurando para disminuir o eliminar el uso de productos químicos que afectan la salud del ambiente y la de los seres vivos que lo ocupan. Por otra parte, procesos industriales, agrícolas y ambientales de los cuales el hombre saca su mayor provecho, se ven beneficiados con el uso de microorganismos benéficos o de sus subproductos y este es el caso del problema que se aborda en esta revisión.

Los probióticos son una de las alternativas que se conoce, estos están elaborados principalmente a base de bacterias benéficas que pertenecen a diferentes géneros como *Lactobacillus* spp, *Bacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, entre otros, que buscan contrarrestar el uso indiscriminado de antimicrobianos ofreciendo efectos positivos para la salud del animal, el medio ambiente y el ser humano.

Esta necesidad expuesta, justifica la realización de una revisión sistemática de las perspectivas que existen con el género *Bacillus* spp y su actividad como microorganismo probiótico, siendo un género de fácil crecimiento y que presenta características fisiológicas que ha generado diferentes puntos de vista sobre su aplicación con esta finalidad.

Esta propuesta se hace para brindar una información completa sobre alternativas como solución aplicada a la necesidad de un país en temas de salud y economía, buscando satisfacer las necesidades del avicultor, el ave y el consumidor.

Esta revisión contribuye desde lo académico porque permite tener una perspectiva sobre el uso de *Bacillus* spp como microorganismo probiótico suministrado en la producción de pollos de engorde y su papel en la regulación de la microbiota intestinal, además de dar solidez al conocimiento que ya existe respecto al tema. Adicionalmente, desde lo económico será un insumo que puede servir de apoyo a los

productores de pollo de engorde y servir como guía para el cumplimiento de los estándares de calidad de las industrias involucradas en la comercialización de pollos de engorde, con el objetivo de reducir pérdidas económicas por enfermedades en las aves.

A nivel social, permite cambiar la perspectiva que tienen muchas personas sobre los microorganismos, recordando que pueden ser utilizados como herramientas que proporcionan muchos beneficios, además de tomar consciencia sobre la problemática de la resistencia bacteriana impulsando a la búsqueda de alternativas que disminuyan el uso de antimicrobianos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Realizar una revisión sistemática sobre el uso del género *Bacillus* spp como suplemento probiótico con el fin de establecer las perspectivas que presenta este género para modular la microbiota intestinal en la producción de pollos de engorde.

2.2 Objetivos específicos

- Recopilar mediante revisión sistemática documentos científicos sobre el tema objeto de revisión.
- Especificar cuáles especies de *Bacillus* spp se utilizan como suplemento probiótico con el fin de coadyuvar la salud del pollo de engorde en producción.
- Analizar con la información obtenida la pertinencia del uso de *Bacillus* spp como suplemento probiótico para modular la microbiota intestinal en la producción de pollos de engorde y cuáles podrían ser los efectos sobre la salud humana por el consumo de carne de pollo producida bajo la suplementación probiótica.

3. Marco normativo

3.1 Decreto

Decreto 3518 de 2006

“Por el cual se crea y reglamenta el Sistema de Vigilancia en Salud Pública y se dictan otras disposiciones” (14).

Objeto: El objeto del presente decreto es crear y reglamentar el Sistema de Vigilancia en Salud Pública, SIVIGILA, para la provisión en forma sistemática y oportuna, de información sobre la dinámica de los eventos que afecten o puedan afectar la salud de la población, con el fin de orientar las políticas y la planificación en salud pública; tomar las decisiones para la prevención y control de enfermedades y factores de riesgo en salud; optimizar el seguimiento y evaluación de las intervenciones; racionalizar y optimizar los recursos disponibles y lograr la efectividad de las acciones en esta materia, propendiendo por la protección de la salud individual y colectiva.

3.2 Resoluciones

Resolución 1515 de 2015

“Por medio de la cual se establece los requisitos para obtener el Registro Sanitario de Predio Avícola (RSPA)” (15).

Considerando:

Que es necesario regular y controlar sanitariamente la actividad avícola estableciendo los requisitos para el registro de granjas avícolas, para definir estrategias en la prevención, control y erradicación de enfermedades de la especie aviar, por lo que se hace necesario establecer como obligatorio el Registro Sanitario de Predio Avícola.

Que el Registro Sanitario de Predio Avícola será la herramienta que permita monitorear la condición sanitaria de los predios productores de aves, con el fin de ejercer control que sirva de base para las certificaciones de granjas avícolas bioseguras y establecer compartimentos libres de enfermedades, entre otras (15).

Resolución 3652 de 2014

“Por medio de la cual se establecen los requisitos para la certificación de granjas avícolas bioseguras de engorde y se dictan otras disposiciones”.

Considerando:

Que el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) es el responsable de proteger la sanidad agropecuaria del país con el fin de prevenir la introducción y propagación de enfermedades que puedan afectar las especies animales domésticas de importancia económica a nivel nacional.

Que es necesario regular y controlar sanitariamente la actividad avícola, estableciendo los requisitos para el certificado de granjas avícolas bioseguras de engorde y definir estrategias para la prevención, control y erradicación de enfermedades de la especie aviar (16).

Que con el fin de prevenir y controlar la presencia de enfermedades aviares se hace necesario establecer como obligatorio el cumplimiento de las medidas básicas de bioseguridad y demás requisitos sanitarios para obtener el Certificado de Granja Avícola Biosegura.

Resolución 1382 de 2013

“Por la cual se establecen los límites máximos para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal, destinados al consumo humano” (17).

Considerando:

Que se hace necesario establecer Límites Máximos para Residuos de Medicamentos Veterinarios en los alimentos de origen animal, destinados al consumo humano, con el objeto de proteger la salud de la población.

Resolución 1966 de 1984

“Por la cual se reglamenta el uso de productos o sustancias antimicrobianas como promotores de crecimiento o mejoradores de la eficiencia alimenticia” (18).

Considerando:

Que el consumo de alimentos de origen animal que contengan sustancias antimicrobianas utilizadas como promotores de crecimiento, conlleva serios peligros para la salud humana y animal relacionados con la transferencia de resistencia y sensibilidad a los antimicrobianos.

Que se requiere racionalizar la utilización de los productos o sustancias antimicrobianas.

Resolución 61252 de 2020

"Por medio de la cual se establecen los requisitos y el procedimiento para el registro de los fabricantes e importadores de alimentos para animales, así como los requisitos y el procedimiento para el registro de alimentos para animales y se dictan otras disposiciones" (19).

3.3 Otros documentos

CONPES 3468: Productos avícolas.

"En este documento se encuentran los lineamientos de política que permitirán mejorar las condiciones de sanidad e inocuidad de la cadena avícola con el fin de proteger la salud y vida de las personas y los animales, preservar la calidad del ambiente, aumentar la competitividad y fortalecer la capacidad para obtener la admisibilidad de sus productos en los mercados internacionales" (20).

4. Marco de referencia

4.1 Probióticos, generalidades

Los seres vivos albergan una cantidad considerable de microorganismos que tienen un beneficio en el funcionamiento adecuado del sistema digestivo. Estos microorganismos ayudan al procesamiento y absorción de nutrientes que no pueden ser captados de manera directa (21). Al momento de presentarse una disrupción en la comunidad microbiana que se encuentra en el aparato digestivo por diversos factores como estrés, uso de antimicrobianos, alimentación, entre otros, se favorece la proliferación de microorganismos patógenos responsables de una variedad de enfermedades (22). Por lo anterior, la recuperación de esa microbiota ha hecho necesario el uso de productos denominados “probióticos” (2).

Un probiótico se define según la OMS y la FAO como “un suplemento alimenticio a base de microorganismos vivos que cuando se administra en las cantidades adecuadas brinda un beneficio al huésped”(4). Los probióticos que se comercializan pueden ser preparados de un solo microorganismo o un conjunto de microorganismos que tengan similitudes en la actividad. La ventaja de utilizar productos multiespecies es que actúan en un mayor espectro a nivel del aparato digestivo (23).

Los microorganismos utilizados como probióticos abarcan desde bacterias hasta hongos levaduriformes y filamentosos., Las bacterias son las más investigadas y entre ellas se encuentran las del género *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp y *Streptococcus* spp, entre otros (2).

4.1.1 Importancia de los probióticos

Los microorganismos con actividad probiótica tienen una función primordial que es actuar como protectores del equilibrio de la microbiota intestinal, con el fin de evitar la colonización de patógenos como *Salmonella* spp (24), *Shigella* spp (25), *Clostridium* spp (26) responsables de enfermedades gastrointestinales e incluso la muerte. En el tracto gastrointestinal de humanos y animales se encuentran millones de bacterias entre las que se pueden mencionar a los géneros *Bifidobacterium* spp, *Lactobacillus* spp, las cuales son productoras de diferentes metabolitos que brindan un beneficio al huésped (27).

Como se mencionó, los probióticos son capaces de prevenir el establecimiento de enteropatógenos, función que puede realizarse a través de mecanismo directo como la producción de metabolitos que inhiben o impiden la colonización del enteropatógeno o a través de la estimulación del sistema inmunológico. A continuación, en la tabla 1 se resumen algunos de los beneficios atribuidos a los probióticos:

Tabla 1. Beneficios de los probióticos en pollos de engorde

Beneficios de los probióticos	Referencia
Mejora de la microbiota gastrointestinal	(17,18).
Mejora del sistema inmunitario	
Protección frente a enteropatógenos	
Mejora la absorción de nutrientes	

4.1.2 Criterios para que un microorganismo sea considerado probiótico

Según un estudio publicado por Fijan en el 2014 (27), las características probióticas de las cepas bacterianas y levaduras son:

- Tener alta tolerancia al ácido y la bilis.
- Presentar la capacidad de adherirse a las superficies intestinales.
- Resistir pH bajo, particularmente el del jugo gástrico.
- Inhibir especies potencialmente patógenas (actividad antimicrobiana).
- Resistir a antimicrobianos, producir exopolisacáridos y eliminar colesterol.

Adicionalmente, Nava de Durán en su trabajo de grado en 2008 (28) resalta otras características a considerar como:

- El microorganismo con potencial probiótico no debe causar infección o enfermedad alguna.
- Debe ser tolerado por el sistema inmunológico del huésped.
- Tiene que presentar la capacidad de sinergia con la microbiota intestinal.
- Potenciar las defensas inmunitarias del huésped.

4.1.3 Mecanismo de acción de los probióticos

Los mecanismos por los cuales actúan los probióticos es diverso, los más conocidos se describen a continuación y se representan en la figura 1:

- Algunos componentes excretados por los microorganismos probióticos como los ácidos grasos de cadena corta favorecen la acidificación del medio gástrico e impiden que proliferen microorganismos patógenos (29).
- La colonización es otro mecanismo por el que actúan los probióticos, y con ella impiden el establecimiento de patógenos en el epitelio intestinal (29).
- Favorecen la producción de una barrera mucoide que recubre al intestino a través de la expresión de las mucinas ileocolónicas MUC2 y MUC3 (29).
- Algunos géneros como *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* sp pueden producir sustancias naturales como las bacteriocinas, bifidocinas y helvecitinas, las cuales presentan un amplio espectro de actividad antimicrobiana (29).
- Estimulación del sistema inmunológico a través de mimetismo molecular.

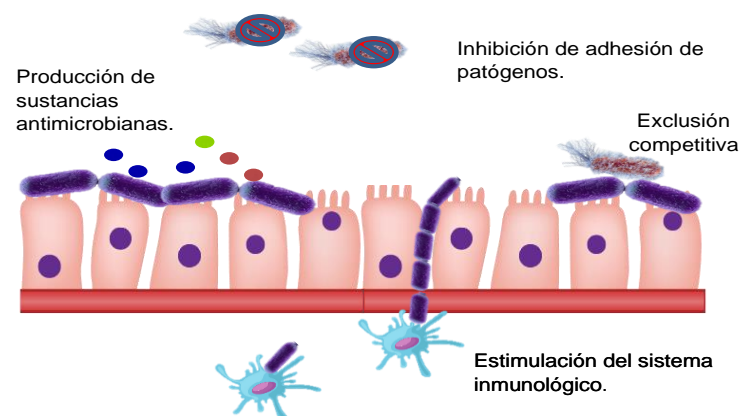


Figura 1. Principales mecanismos de acción de los probióticos. Los probióticos pueden tener mecanismos de acción diferente o compartir más de un mecanismo. Fuente: figura propia.

4.1.4 Microorganismos utilizados como probióticos

Milian et al., (2005) plantean que existen una variedad de microorganismos que pueden ser utilizados como probióticos y, por ende, tienen la capacidad de restaurar la disbiosis. Los microorganismos más utilizados según los autores son *Lactobacillus* sp., *Enterococcus faecium*, *Bacillus* spp. El género *Lactobacillus* spp se caracteriza

por ser reconocido por su crecimiento rápido en el intestino y cuya función es convertir la lactosa en ácido láctico, esto produce una alteración del pH que va a actuar como una barrera para la proliferación de enteropatógenos (30). En la tabla 2, se mencionan algunos microorganismos utilizados de manera frecuente como probióticos.

Tabla 2. Microorganismos usados como probióticos en la avicultura (23–25).

Lactobacillus spp	Bifidobacterium spp	Streptococcus spp	Saccharomyces spp	Otros
<i>L. acidophilus</i>				
<i>L. casei</i> (<i>rhamnosus</i>)	<i>B. bifidum</i>			
<i>L. fermentum</i>	<i>B. breve</i>	<i>S. thermophilus</i>		
<i>L. gasseri</i>	<i>B. lactis</i>	<i>S. salivarius subsp. thermophilus</i>	<i>S. boulardii</i>	<i>Bacillus spp</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. longum</i>			<i>Enterococcus spp</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. infantis</i>			<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. adolescentis</i>			
<i>L. plantarum</i>				
<i>L. reuteri</i>				
<i>L. salivarius</i>				
<i>L. bulgaricus</i>				

En cuanto a hongos levaduriformes y filamentosos, los más usados son *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pintolopesii* (31) como se observa en la Figura 2.

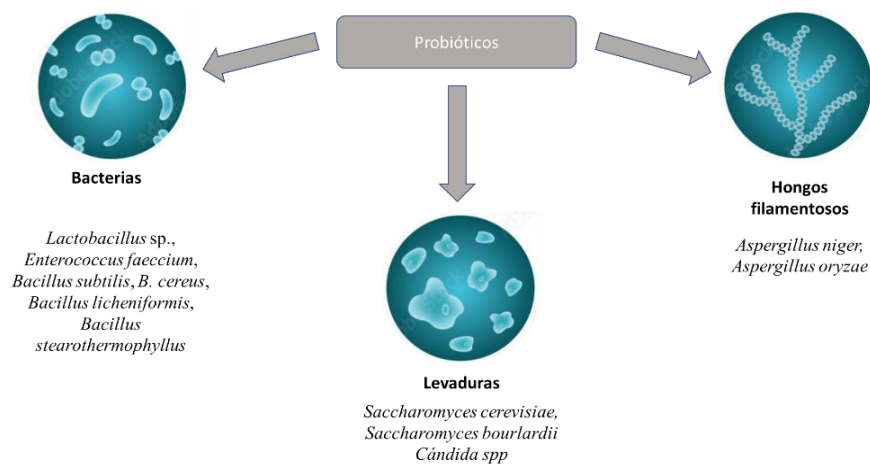


Figura 2. Microorganismos utilizados como probióticos. Los microorganismos más utilizados son las bacterias, seguido de las levaduras y los hongos filamentosos. Fuente: figura propia.

4.2 Industrias que producen probióticos

El incremento de consumo de probióticos a nivel mundial ha favorecido un crecimiento acelerado del mercado. Según información tomada de *Allied Market Research*, el mercado mundial de probióticos se valoró en \$ 34,1 mil millones en 2020 y se proyecta que alcance los \$ 73,9 mil millones para 2030, registrando una CAGR del 8,6% (32).

El mercado de los probióticos está dividido de acuerdo con el ingrediente, la función, aplicación, usuario final y la región. Respecto a la aplicación, se pueden dividir en alimentos y bebidas, suplementos dietéticos y alimentos para animales. Y, por último, respecto al usuario final se fragmenta en humanos y animales. Algunas de las empresas que producen productos con probióticos se detallan en la tabla 3 (33):

Tabla 3. Empresas que producen probióticos.

Empresa	País	Producto Comercial
Danone S.A	Francia	Activia
Lallemand Inc	Canadá	Combocap biotics
Yakult Honsha	Japón	Yakult
Nestlé S.A	Suiza	NANCARE® PROTECT
DuPont	EE.UU	Howaru®
Cr. Hanse	Dinamarca	LGG®
Kerry Inc	Irlanda	GanedenBC ³⁰
Pepsico Inc	EE.UU	PepsiCo's Imunele

El componente principal de los productos probióticos son las bacterias, seguido de las levaduras (26, 27). El uso de probióticos ha presentado un aumento por la conciencia que ha tomado el ser humano sobre los beneficios que estos aportan para la microbiota intestinal, evitando en muchos casos la aparición de enfermedades no solo en humanos sino también en animales de interés comercial como las aves de corral.

4.2.1 Efectos de los probióticos en el rendimiento productivo

Los probióticos como se ha mencionado, son microorganismos que brindan un beneficio al huésped, debido a los diferentes mecanismos que pueden tener para evitar la colonización de enteropatógenos y mantener el equilibrio de la microbiota intestinal. En las aves de producción, el uso de probióticos incrementa la inmunocompetencia y favorece la maduración del tracto gastrointestinal (34). Los microorganismos probióticos producen enzimas digestivas, vitaminas y sustancias antibacterianas como peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, ácidos orgánicos,

componentes de lactonas y acetaldehídos que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas y aumentan la inmunidad, conllevando a una competencia por colonización y un antagonismo bacteriano (35). Además, estos componentes aumentan la digestión y absorción de nutrientes, lo que mejora el peso corporal (36), resultando en un factor positivo para los indicadores de producción.

4.2.2 Sectores donde se aplican los probióticos

Existe gran interés en los probióticos en los últimos años, debido a los efectos positivos que tienen para la salud. La investigación avanza en descubrir en que otros campos pueden ser utilizados estos microorganismos, ya que en la actualidad se utilizan en el sector farmacéutico, agrícola y en la medicina humana (2). Esto se debe a que la mayoría de estos microorganismos tienen la capacidad para producir diferentes componentes que pueden ser utilizados como medicamentos, promotores de crecimiento e incluso como antimicrobianos, disminuyendo el uso de productos químicos que a largo plazo terminan afectando la salud del huésped. Aún queda mucho campo por investigar y muchos microorganismos que no se conocen que puedan presentar actividad probiótica, por lo que no es extraño que en uno o cinco años la lista de microorganismos y el campo de aplicación sea más extenso.

4.3 *Bacillus* spp, características

En 1872, Ferdinand Cohn establece el nombre del género *Bacillus*, debido a que las bacterias que observó tenían forma de bastón y eran filamentosas. En 1876 Ferdinand Cohn y Koch, descubrieron que algunas especies de este género (*B. subtilis* y *B. anthracis*) forman una estructura especial que le permitía a la bacteria sobrevivir al calor y ebullición, lo que se conoció posteriormente como endospora. Esta característica descubierta se utilizó en 1884 por De Bary como parámetro de clasificación (37).

Las especies de *Bacillus* pertenecen al Dominio bacteria; filo firmicutes; clase Bacilli, Orden Bacillales y Familia Bacillaceae (Figura 4) (38). Estas especies están estrechamente emparentadas con *Lactobacillus* spp, el probiótico más conocido. Ambos géneros pertenecen al mismo filo y clase (39).

Desde el punto microbiológico, las bacterias clasificadas en el género *Bacillus* spp se consideran Gram positivas (Figura 3b), con forma de bastón, aerobias o anaerobias facultativas y formadoras de esporas (30). Se caracterizan además por ser productoras de una amplia variedad de metabolitos que pueden ser usados como antimicrobianos, así como por las enzimas hidrolasas cuya acción de rompimiento de moléculas ayuda al control de algunos patógenos.

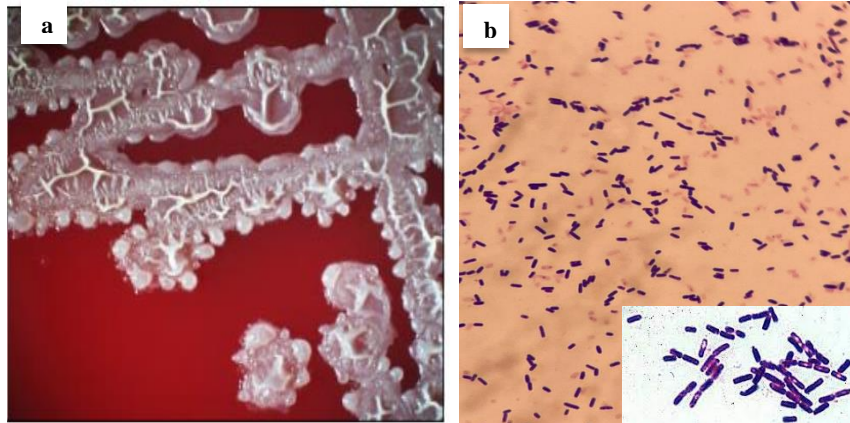


Figura 3. a) Colonia en agar sangre (40) y b) coloración de Gram de *Bacillus subtilis* (figura propia). En agar sangre se pueden observar colonias de aspecto mucoso o rugoso con bordes regulares. En el Gram se observan Bacilos Gram positivos.

Las especies que pertenecen a este género son muy resistentes a muchas condiciones adversas, esto se debe a la producción de esporas. Estas estructuras son de morfología esférica u ovoides (30), lo que permite que el material genético y las enzimas vitales de las bacterias se protejan en caso de escasez de nutrientes o condiciones no adecuadas para la multiplicación bacteriana.

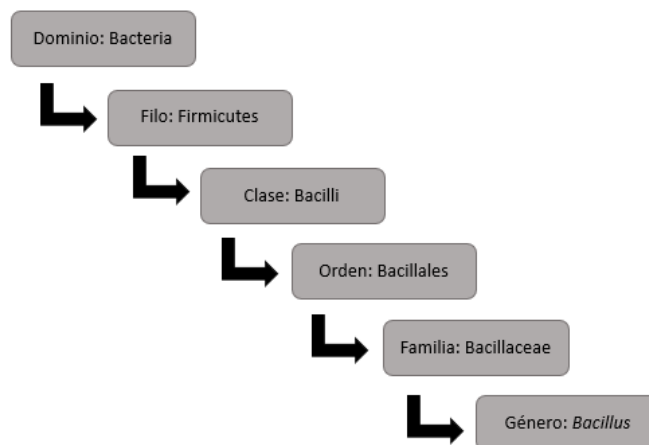


Figura 4. Taxonomía del género *Bacillus* spp (41). Fuente: figura propia.

En cuanto a requerimientos nutricionales, la mayoría de las especies pueden crecer en medios básicos como agar sangre y nutritivo (41), aunque algunas especies pueden requerir nutrientes más complejos como aminoácidos y proteínas para crecer.

Algunas de las propiedades fisiológicas son las que han llamado la atención a las industrias farmacéuticas, agrícolas y alimentarias. Entre ellas se puede destacar la capacidad de producción de esporas que pueden ser utilizadas por las diversas propiedades que ha demostrado. Otra de las propiedades que caracteriza a este género es la producción de enzimas hidrolasas como amilasas, proteasas y glicosidasas (30), que interfieren en la descomposición de moléculas complejas a más sencillas para que puedan ser absorbidas más rápido por el cuerpo.

Por otra parte, algunas especies de *Bacillus* se han caracterizado por la producción de sustancias antimicrobianas que incluyen antimicrobianos peptídicos y lipopeptídicos, los cuales pueden ser clasificados en dos grupos: péptidos ribosómicos (bacteriocinas) y no ribosómicos (polimixinas e iturinas)(42).

Las bacteriocinas, muestran un alto grado de especificidad de diana frente a bacterias estrechamente relacionadas, aunque muchas tienen un espectro de actividad más amplios (43), muchas otras sustancias antimicrobianas producidas por *Bacillus* spp que no están bien caracterizadas se conocen como sustancias inhibidoras similares a las bacteriocinas (BLIS) (44). En el caso de los péptidos no ribosómicos, los antimicrobianos lipopeptídicos identificados hasta ahora se han dividido en tres grupos principales según su estructura: grupo iturina y macrolactonas, al igual que los grupos surfactina y fengicina , los cuales presentan actividad antifúngica y antibacteriana (45)(46).

4.3.1 Aplicación de *Bacillus* spp en diferentes sectores

El género *Bacillus* sp por sus características fisiológicas, su distribución, su poca exigencia a nivel nutricional ha permitido que las especies que se encuentren en este género sean investigadas con mayor profundidad para determinar las aplicaciones que se le puedan dar.

Una de las propiedades que ha llamado la atención de este género es la producción de enzimas hidrolasas (47), que han mostrado un gran potencial en la aplicación en

el sector farmacéutico, así como en el sector agrícola. Las características de estas enzimas son notables, debido a que pueden soportar cambios de pH y temperaturas, y un rango de estabilidad a compuestos tóxicos.

Estas enzimas pueden ser utilizadas directamente como medicamentos como es el caso de la amilasa (*Bacillus* spp), utilizado para la degradación de almidón en situaciones donde se presenta deficiencia natural de esta enzima. Otra enzima es la subtilisina DFE, que muestra ser un tratamiento prometedor para la terapia trombótica (48).

En cuanto al sector avícola, algunas especies de este género como *B. subtilis*, *B. amyloquefaciens* y *B. licheniformis* (49) se han utilizado como probióticos. Observándose principalmente en *B. subtilis* una excelente bacteria para mejorar la absorción de nutrientes y estimular el crecimiento en las aves (50).

Las aplicaciones que se han encontrado en este género son por el uso directo del bacilo o por la purificación de componentes que se producen a través del metabolismo bacteriano, ganando interés en diversos sectores industriales (Figura 5).

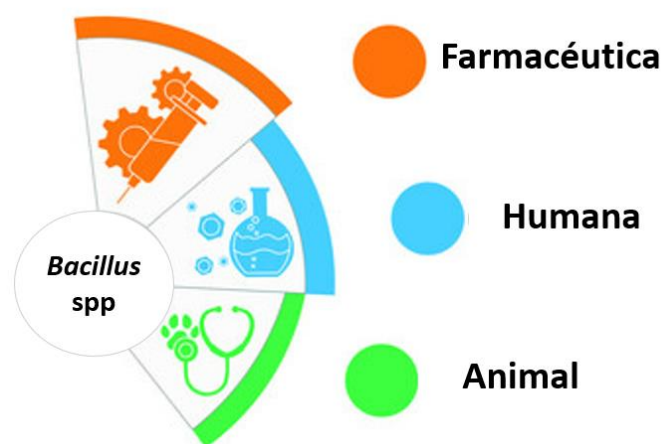


Figura 5. Aplicaciones de *Bacillus* spp en diferentes sectores. Fuente: figura propia.

4.3.2 *Bacillus* spp: patógeno o probiótico

Diferentes especies de *Bacillus* spp se han estudiado por sus características probióticas, sin embargo, las etiquetas que tiene este género es porque sigue la discusión si es patógeno o probiótico. La seguridad y eficacia de las especies de este género se han demostrado en diferentes investigaciones, sin embargo, pocos estudios han planteado inquietudes sobre su seguridad y dosis en personas y

animales inmunodeprimidos, ignorando que algunas especies pueden aprovechar el estado inmunológico del huésped y producir una patología. Por lo anterior, es importante conocer a detalle la cepa que se va a utilizar como probiótico a nivel de fenotipo y genotipo y tener una fundamentación sobre su estado GRAS (Generalmente reconocido como seguro)(51).

4.4 Modulaci3n de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal como se conoce, es una comunidad compleja de microorganismos que incluyen bacterias, virus, hongos, entre otros. Se encuentran en el tracto gastrointestinal de humanos y animales (en este caso las aves), desempeñando una variedad de funciones, como permitir una mejor absorci3n de los nutrientes hasta la protecci3n del huésped. El tracto gastrointestinal (TGI) de los polluelos no es estéril, debido a una previa colonizaci3n a trav3s del oviducto con microbiota de la gallina o a trav3s de la eclosi3n (52), la cual se establece en el intestino y pasa a formar parte de la microbiota normal, modificándose a trav3s del tiempo (Figura 6).

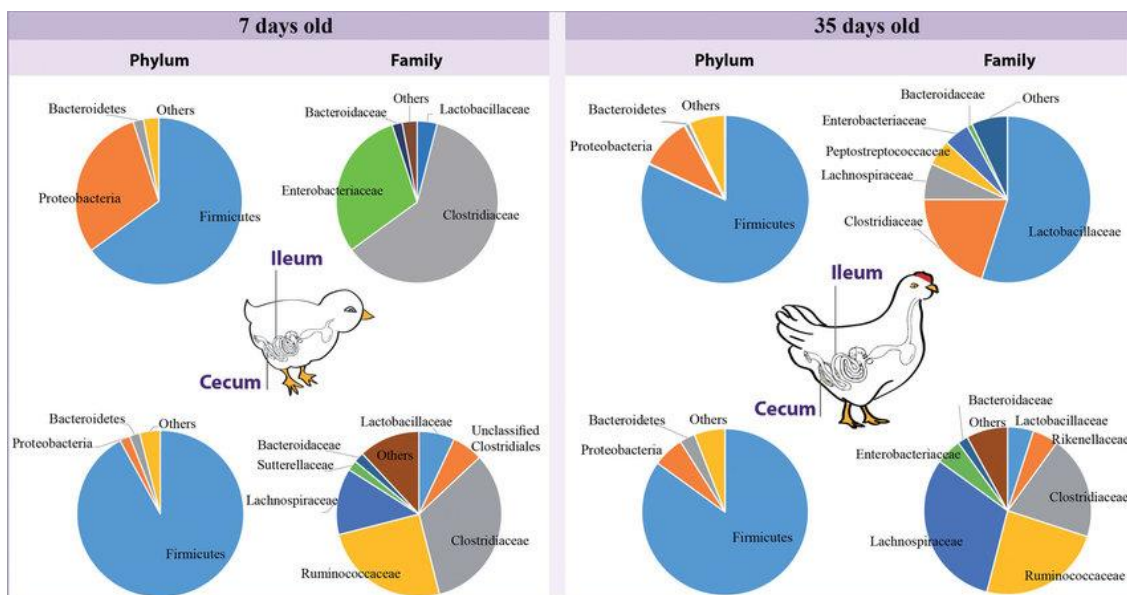


Figura 6. Microbiota intestinal del pollo de engorde.

Descripci3n general de la abundancia relativa de los fil0s bacterianos dominantes y las familias de la microbiota ileal (nivel superior) y cecal (nivel inferior) de los pollos de engorde en dos edades diferentes, 7 y 35 d0as (53).

Esta variación en la composición de la microbiota se explica principalmente por la edad, el peso corporal de los pollos de engorde, la profundidad de la cripta del íleon y el color del contenido cecal (54).

Una adecuada composición de la microbiota intestinal es necesaria para la digestión y absorción de nutrientes, así como para el desarrollo del epitelio intestinal y el sistema inmunológico del ave (55). Como se ha mencionado, las bacterias que se encuentran en el TGI van a desempeñar diversas funciones a través de la producción de vitaminas, ácidos grasos de cadena corta, componentes antimicrobianos como las bacteriocinas, que impiden que el epitelio intestinal sea colonizado por enteropatógenos y provoquen alguna enfermedad, lo anterior lleva a un efecto positivo en la nutrición y la inmunocompetencia del ave.

Se conoce que hay factores que pueden interferir en el equilibrio de la microbiota intestinal, los cuales se dividen en factores externos e internos. Entre los factores externos, se encuentra la alimentación, el agua y el ambiente en el que se encuentra el ave. En cuanto a los factores internos se pueden mencionar las condiciones del criadero y la nutrición dada por el criador (55). Cuando se presenta un desequilibrio a nivel de la microbiota intestinal, el ave queda desprotegida y propensa a ser colonizada por microorganismos con potencial patógeno como *Salmonella* spp (23) , *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, entre otros, los cuales son responsables de enfermedades gastrointestinales que pueden conducir a la muerte del animal. En aves de interés comercial como es el caso de los pollos de engorde, cuando se infectan con alguno de estos enteropatógenos conlleva a pérdidas económicas, debido a que usualmente no se infecta un solo pollo sino toda la parvada.

Por lo anterior, cuando se determina que la microbiota intestinal del ave se encuentra afectada, lo ideal es tratar de recuperar ese equilibrio lo antes posible a través del uso de varios aditivos en la alimentación del animal como los probióticos, los cuales van a ayudar a recuperar la armonía microbiana en el TGI (7).

4.4.1 Tracto gastrointestinal de las aves - TGI

El TGI del pollo incluye la bolsa (buche), el proventrículo, la molleja, el duodeno, el yeyuno, el íleon, los ciegos, intestino delgado y la cloaca (56). Cada parte del TGI de las aves tiene una función, un pH y una concentración microbiana diferente, lo que

permite que en cada sitio se lleve a cabo un proceso de la digestión para pasar al siguiente (Figura 7).

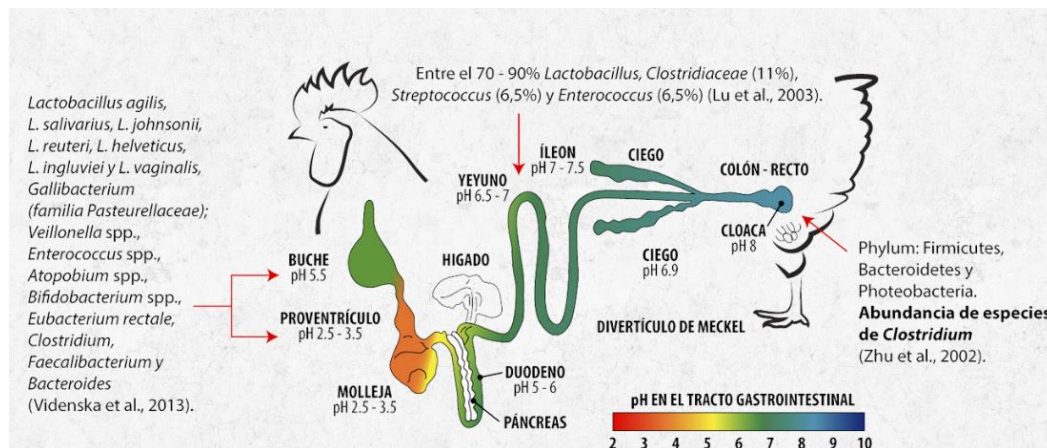


Figura 7. Cambios espaciales de la microbiota intestinal de las aves (40). Cada porción del TGI de las aves tiene un pH específico que favorece la diferenciación de la microbiota de forma espacial.

A continuación, se realiza una explicación breve de las partes del TGI de las aves de acuerdo con una publicación de Svihus (57):

- **Buche:** de acuerdo con este autor, se cree que el buche tiene principalmente un papel como órgano de almacenamiento para las aves en situaciones de alimentación discontinua, y no está involucrado en la regulación del consumo de alimento.
- **Proventrículo:** secreta ácido clorhídrico y pepsinógeno, que se mezclan con el contenido debido a los movimientos musculares de la molleja
- **Molleja:** tiene una función importante en la molienda del material de alimentación, ya que esto no se hace en la boca.
- **Intestino delgado:** es el lugar donde se lleva a cabo la mayor parte de la digestión y prácticamente toda la absorción de nutrientes.
- **Duodeno:** sitio donde se lleva a cabo la mezcla del alimento con enzimas y bilis para digerirla.
- **Yeyuno:** su importancia radica en que todos los nutrientes principales se digieren y absorben en gran medida aquí.
- **Íleon:** es la última fracción del intestino delgado. Su función principalmente es la absorción de agua, vitaminas y minerales.

- **Ciego:** una función importante del ciego es la absorción de electrolitos y agua, por lo que los ciegos se han descrito como el segmento cuantitativamente más importante del intestino.
- **Cloaca:** es un órgano común a los tractos urinario, digestivo y reproductivo.

Un correcto funcionamiento del tracto gastrointestinal del ave permitirá un desarrollo adecuado, además de la dieta y el sistema de alimentación que pueden tener un efecto negativo o positivo en la función digestiva.

4.4.2 Pollos de engorde, generalidades

Se les llama pollos de engorde o broiler a una variedad de pollos que son criados con fines de producción específicamente de carne (58). Para el comercio de estos pollos deben alcanzar un peso de sacrificio de aproximadamente 2 Kg que tarda entre las cuatro a siete semanas de edad. Una línea común de pollos de engorde combina los genes de las línea Cornish y White Plymouth Rock para obtener plumas blancas y un crecimiento más rápido (Figura 8) (59).

Las condiciones en las que se crían los pollos de engorde es a bajas intensidades lumínicas (<10 lux), para disminuir su actividad y aumentar de esta manera la velocidad de crecimiento y ganancia de peso media diaria. Por otra parte, el pollo de engorde es sometido a fotoperiodos de 23 horas (60).



Figura 8. Pollo Cobb 500 (61). Se distinguen por su plumaje blanco, buen desarrollo muscular y alas cortas.

El comportamiento de los pollos de engorde se va alterado a medida que va creciendo, modificándose entre otros, el comportamiento sexual que disminuye con la edad. Respecto a la alimentación, los pollos de engorde tienen acceso a una dieta

especial de alimentos ricos en proteínas, entregados a través de un sistema de alimentación automatizado en la mayoría de las empresas dedicadas a esta actividad.

La industria de pollos de engorde ha estado en crecimiento, pero el obstáculo que deben enfrentar este sector son las enfermedades que afectan a las aves, situación que deriva en ocasiones en grandes pérdidas económicas.

4.4.3 Líneas de pollos de engorde

Existen diferentes líneas de pollos de engorde que se encuentran disponibles en el mercado, entre las que se pueden mencionar: Cobb, Ross y Hubbard

- **Línea Cobb:** es una línea de pollo de engorde moderna que se caracteriza principalmente por su excelente productividad, tasa de crecimiento y bajo costo de producción (62).



Figura 9. Pollo de engorde línea Cobb (62).

- **Línea Ross:** se caracteriza por su alta adaptabilidad, mayor rendimiento de carne y mejor eficiencia en la conversión alimenticia. Además, de ser bastante resistentes a las enfermedades metabólicas (63).
- **Línea Hubbard:** ofrece una alta productividad, su alta adaptabilidad, alta eficiencia y bajo costo de producción (64).



Figura 10. Hembra reproductora Hubbard F15 y macho Hubbard M77(64).

4.4.3 Enfermedades que afectan a los pollos de engorde

Algunas de las enfermedades bacterianas de importancia en los pollos de engordes se expresan en la siguiente tabla (65):

Tabla 4. Enfermedades de importancia en pollos de engorde (65).

Enfermedad	Agente causal	Presentación	Signos clínicos
Salmonelosis	<i>Salmonella</i> spp.	Aguda	Anorexia, diarrea e incluso la muerte.
Enteritis necrótica	<i>Clostridium perfringens</i>	Se manifiesta tanto en forma aguda o forma crónica.	Necrosis severa de la mucosa intestinal
Colibaciliosis	<i>E. coli</i>	Aguda	Variables según la localización de la infección

Para hacerle frente a esta problemática se han utilizado antimicrobianos en forma indiscriminada, teniendo como consecuencia bacterias multirresistentes (65–67), lo cual termina convirtiéndose en un problema de salud pública, por lo cual los probióticos aparecen como la alternativa para combatir a estos patógenos.

5. Diseño metodológico

Esta investigación es de tipo documental y descriptiva, en la cual se organiza la información que se extrajo de artículos científicos, libros, tesis, entre otros documentos. El protocolo de búsqueda de la información se basó en la recopilación de referencias científicas publicada entre 2000 al 2021 sobre el uso del género *Bacillus* spp como probiótico en pollos de engorde. Esta búsqueda se llevó a cabo en diferentes bases de datos como la de la Biblioteca Agropecuaria de Colombia (BAC), Springer, Nature, Oxford academic, PubMed, y ScienceDirect, así como tesis publicadas en los repositorios de universidades.

En todo el proceso de recopilación de la información se hizo uso de los operadores o conectores booleanos básicos “AND”, “OR” y “NOT”, los cuales sirvieron para conectar las palabras claves y obtener una mayor especificidad de los escritos que trataban del tema a trabajar. A partir de toda la información obtenida, se revisaron los artículos seleccionados, con el objetivo de realizar un análisis más detallado de cada uno y verificar que cumplieran con todos los criterios de inclusión.

5.1 Criterios de inclusión

Selectividad: se realizó una recopilación inicial de textos que incluyera todo tipo de información respecto al género *Bacillus* spp, sin importar país de origen.

Pautas de búsqueda: se realizó una base de datos con la literatura que resultaba al buscar con las palabras claves en inglés y español “*Bacillus* spp” “probióticos” “pollo de engorde”, “microbiota intestinal” e “inmunomodulación”.

Tipo de publicaciones e idiomas: se seleccionaron los artículos científicos, tesis, libros, en español, inglés y portugués, que contenían información sobre las especies más utilizadas de *Bacillus* spp, como microorganismos probióticos para la modulación de la microbiota intestinal de los pollos de engorde.

Período de búsqueda: para tener una perspectiva más amplia del género *Bacillus* spp con relación a las aplicaciones y el uso de este género como probiótico, se seleccionó toda la literatura publicada entre los años 2000 al 2021.

5.2 Criterios de exclusión

Publicaciones duplicadas: Se descartaron aquellos textos similares de acuerdo con su título o contaban con la misma información en cuanto al objeto de investigación utilizando el software de gestión de referencias Mendeley.

Selección definitiva: teniendo en cuenta el análisis de cada texto y la base de datos, se realizó la elección de la literatura a utilizar, excluyendo aquella que no cumplía con los siguientes criterios:

- Publicaciones en la que hablaban de probióticos sin utilizar ninguna especie del género *Bacillus* spp.
- Publicaciones en las que utilizan microorganismos con actividad probiótica diferentes a *Bacillus* spp.
- Literatura que no proporciona información sobre la microbiota intestinal de pollos de engorde.
- Publicaciones en las que se usa *Bacillus* spp como probiótico en animales diferentes a pollos de engorde.

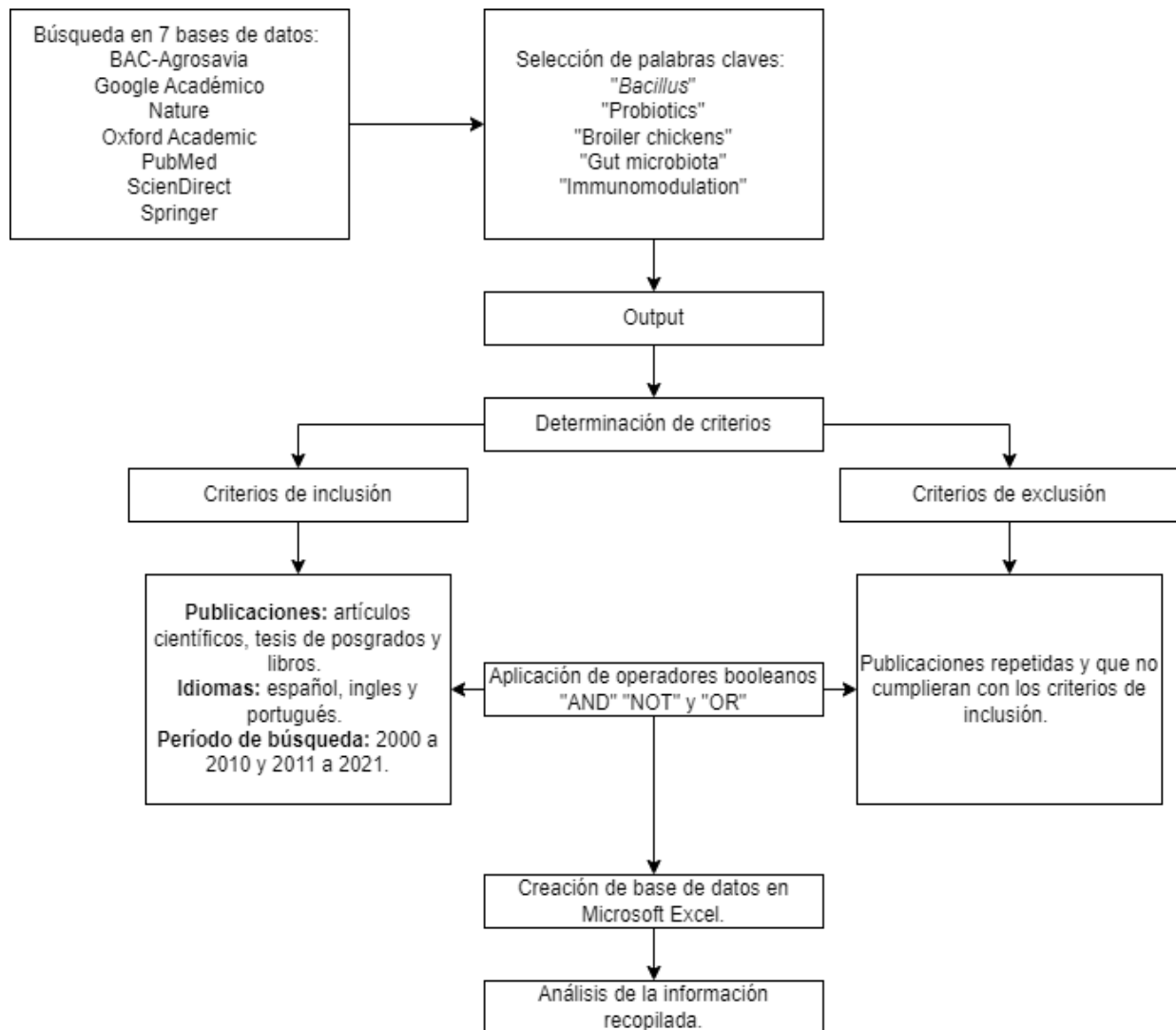


Figura 11. Esquema de la metodología utilizada.

6. Resultados y discusión

Análisis de la Información recopilada

De acuerdo con los criterios de inclusión que se establecieron para realizar la búsqueda de información que abarcó los años 2000 a 2021, divididos en dos periodos entre 2000 a 2010 y entre 2011 a 2021, se logró evidenciar que las publicaciones en las que se abordaba el tema de *Bacillus* spp como probiótico utilizado en pollos de engorde presentó un aumento en el periodo comprendido entre 2011 a 2021 en comparación con el primer periodo analizado. A continuación, se presentan los diagramas de flujo de los dos periodos (Figura 12 y 13).

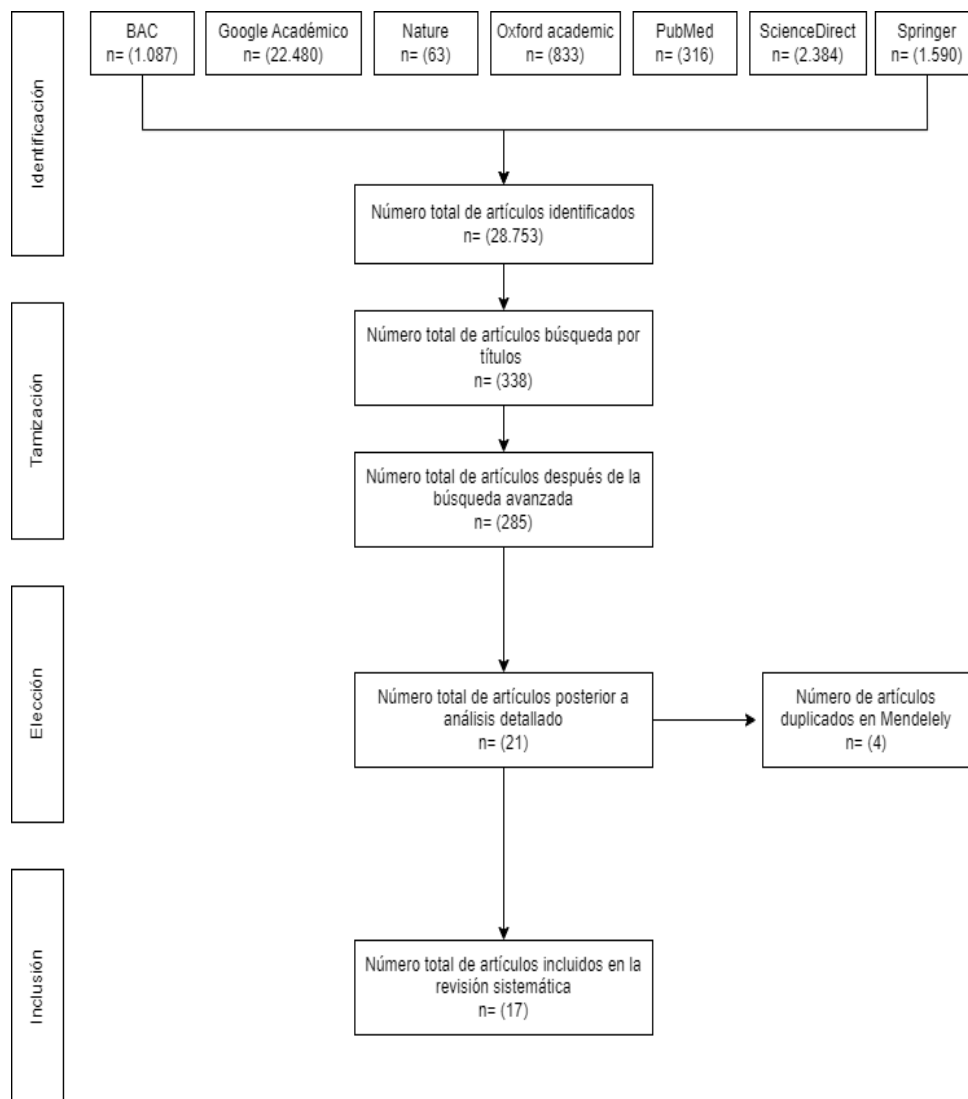


Figura 12. Diagrama de flujo del proceso de identificación y selección de textos incluidos en la revisión sistemática periodo entre 2000 a 2010.

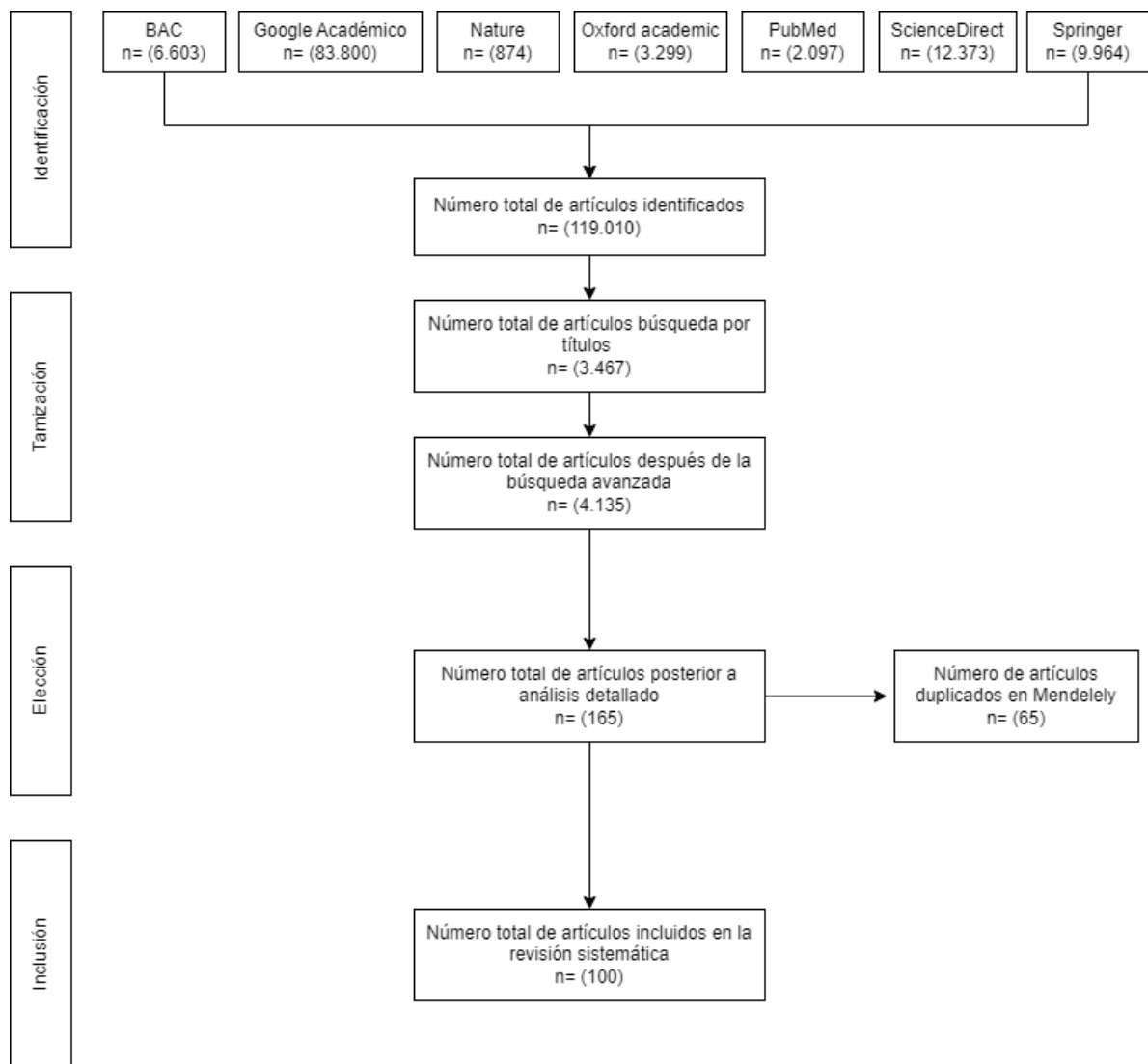


Figura 13. Diagrama de flujo del proceso de identificación y selección de textos incluidos en la revisión sistemática periodo entre 2011 a 2021.

Al realizar la búsqueda preliminar de la literatura, se logra evidenciar que se cuenta con un buen número de artículos al usar las palabras claves y el periodo de tiempo establecido. Para llevar un seguimiento, la información de los artículos encontrados se organiza en el programa Microsoft Excel que permite graficar y comparar el número de publicaciones del tema de interés entre ambos periodos.

Con base en lo anterior, se realiza la primera búsqueda que comprende el periodo entre 2000 y 2010 en las bases de datos correspondientes, haciendo uso de las palabras clave y los operadores booleanos, obteniéndose un total 28.753 artículos

(Tabla 5). Respecto al segundo periodo comprendido entre 2011 y 2021, se obtiene un total de 119.070 artículos (Tabla 6).

Tabla 5. Búsqueda por correlación preliminar entre palabras claves y periodo de publicación 2000 – 2010.

PALABRAS CLAVES	BAC	Google Académico	Nature	Oxford Academic	PubMed	Science Direct	Springer
" <i>Bacillus</i> " and "probiotics"	881	12.600	28	359	279	1.520	1.007
" <i>Bacillus</i> " and "broiler chickens"	102	3.410	0	198	16	275	114
" <i>Bacillus</i> " and "gut microbiota"	35	2.410	15	76	12	186	150
" <i>Bacillus</i> " and "immunomodulation"	69	4.060	20	200	9	403	319
Subtotal	1.087	22.480	63	833	316	2.384	1.590
Total				28.753			

De acuerdo con el primer periodo, se logra evidenciar que el número de publicaciones que abordan el tema de *Bacillus* spp como probiótico en pollos de engorde, muestra un resultado de 28.753 publicaciones en las bases de datos consultadas, lo anterior, puede deberse a que era un tema que no era de interés en el momento o era un tema complejo de abordar. Para el segundo periodo, el número de publicaciones respecto al tema muestra un aumento, pero comparado con otros temas sigue siendo bajo el número de publicaciones.

Tabla 6. Búsqueda por correlación preliminar entre palabras clave y periodo de publicación 2011 – 2021.

PALABRAS CLAVES	BAC	Google Académico	Nature	Oxford Academic	PubMed	Science Direct	Springer
" <i>Bacillus</i> " AND "probiotics"	4.892	31.200	325	1.389	1.481	6.944	5.488
" <i>Bacillus</i> " AND "broiler chickens"	492	13.700	18	581	160	791	485
" <i>Bacillus</i> " AND "gut microbiota"	926	26.000	456	867	368	3.341	2.929
" <i>Bacillus</i> " AND "immunomodulation"	293	12.900	75	462	88	1.297	1.062
Subtotal	6.603	83.800	874	3.299	2.097	12.373	9.964
Total				119.010			

Posteriormente, se establece una estrategia similar con una búsqueda de correlación entre las palabras clave, aplicando en función de cada base de datos la revisión de

títulos de los textos seleccionados [Title]. Este procedimiento arroja 338 artículos publicados entre los años 2000 a 2010 (Tabla 7), y 3.467 artículos para el intervalo entre 2011 a 2021 (Tabla 8).

Tabla 7. Búsqueda por correlación preliminar entre revisión de títulos 2000 – 2010.

PALABRAS CLAVES	BAC	Google Académico	Nature	Oxford Academic	PubMed	Science Direct	Springer
"Bacillus" AND "probiotics"	121	46	16	9	11	22	52
"Bacillus" AND "broiler chickens"	8	8	0	2	2	3	6
"Bacillus" AND "gut microbiota"	3	3	12	0	2	1	4
"Bacillus" AND "immunomodulation"	1	2	0	0	0	1	3
Subtotal	133	59	28	11	15	27	65
Total				338			

Tabla 8. Búsqueda por correlación preliminar entre revisión de títulos 2011– 2021.

PALABRAS CLAVES	BAC	Google Académico	Nature	Oxford Academic	PubMed	Science Direct	Springer
"Bacillus" and "probiotics"	1.001	200	263	76	64	171	538
"Bacillus" and "broiler chickens"	138	117	25	17	71	34	42
"Bacillus" and "gut microbiota"	61	59	316	0	35	16	108
"Bacillus" and "immunomodulation"	5	4	66	0	1	1	38
Subtotal	1.205	380	670	93	171	222	726
Total				3.467			

Otra estrategia implementada, se realiza con una búsqueda avanzada con el operador booleano "OR", debido a que, los resultados preliminares cuentan con una cantidad representativa en número de textos por cada una de las bases de datos seleccionadas.

Tabla 9. Estrategia de búsqueda sistemática en bases de datos.

Estrategia de búsqueda sistemática en bases de datos	
Paso 1	Idea de estudio
	Uso del género <i>Bacillus</i> spp como suplemento probiótico en pollos de engorde para modular la microbiota intestinal
	Población Pollos de engorde
	Intervención Mejora de la salud animal
Paso 2	Problema de estudio
	Alternativa <i>Bacillus</i> spp
	Resultados Perspectiva del uso de <i>Bacillus</i> como probiótico para modular la microbiota intestinal en pollos de engorde

Paso 3	Pregunta problema	¿Cuál es el efecto que podría tener el uso de probióticos elaborados con bacterias del género <i>Bacillus</i> spp si se utiliza como alternativa moduladora en pollos de engorde?	
Paso 4	Similitud de términos en bases de datos MESH-PubMed	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
		Probiotics	Probiotics
		Broiler chickens	Broilers
		Gut microbiota	Intestinal microbiota
		Immunomodulation	Immune response
Paso 5	Planteamiento de búsqueda avanzada por términos de similitud en significado a las palabras clave	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
		Probiotics	Probiotics
		Broiler chicken	"Broiler chickens OR broilers"
		Gut microbiota	"Gut microbiota OR Intestinal microbiota"
		Immunomodulation	" Immunomodulation OR immune response"
Paso 6	Búsqueda Avanzada BAC	" <i>Bacillus</i> " AND "Broiler chickens OR broilers" AND "Gut microbiota OR Intestinal microbiota"	
	Búsqueda Avanzada Google Académico	" <i>Bacillus</i> " +"broiler chickens" +"gut microbiota" OR"intestinal microbiota" +"immunomodulation" OR"immune response"	
	Búsqueda Avanzada Nature	<i>Bacillus</i> AND Broiler chickens OR broilers	
	Búsqueda Avanzada Oxford Academic	(<i>Bacillus</i>) AND (immunomodulation OR immune response) AND (broiler chickens)	
	Búsqueda Avanzada PubMed	(<i>Bacillus</i>) AND (broiler chickens OR broilers) AND (gut microbiota OR intestinal microbiota) AND (immunomodulation OR immune response)	
	Búsqueda Avanzada ScienceDirect	(<i>Bacillus</i>) AND (Probiotics) AND (Broiler chickens OR broilers) AND (Gut microbiota OR Intestinal microbiota) AND (Immunomodulation OR immune response)	
	Búsqueda Avanzada Springer	(<i>Bacillus</i>) AND (probiotics) AND (Broiler chickens OR broilers) AND (gut microbiota OR intestinal microbiota)	
Paso 7	Selección de artículos según la pregunta problema, criterios de inclusión y exclusión	Artículos científicos, Artículos de revisión, Tesis de posgrado.	

Teniendo en cuenta lo anterior, a partir de la estrategia de búsqueda avanzada se obtiene un total de 285 artículos publicados en las bases de datos seleccionadas correspondiente al período entre 2000-2010 (Tabla 10). Respecto al periodo comprendido entre 2011-2021 el número de artículos publicados en las bases de datos fue de 4.135 (Tabla 11).

Tabla 10. Búsqueda mediante estrategia de búsqueda avanzada durante el periodo 2000 – 2010.

Palabras claves	BAC	Google Académico	Nature	Oxford Academic	PubMed	Science Direct	Springer
(<i>Bacillus</i>) AND (probiotics) AND (broiler chickens OR broilers) AND (gut microbiota OR intestinal microbiota) AND (immunomodulation OR immune response)	2	219	0	7	0	39	18
Total				285			

Tabla 11. Búsqueda mediante estrategia de búsqueda avanzada durante el periodo 2011 – 2021.

Palabras claves	BAC	Google Académico	Nature	Oxford Academic	PubMed	Science Direct	Springer
(<i>Bacillus</i>) AND (probiotics) AND (broiler chickens OR broilers) AND (gut microbiota OR intestinal microbiota) AND (immunomodulation OR immune response)	119	3.330	24	20	20	348	274
Total				4.135			

De acuerdo con los resultados obtenidos por los criterios de inclusión y exclusión, se hace la lectura y un análisis de cada uno de los artículos seleccionados de acuerdo con la pregunta orientadora y objeto del estudio, quedando una recopilación en Mendeley de 21 artículos para el período comprendido entre 2000-2010, mientras que para el segundo período comprendido entre 2011-2021 se obtienen 165 artículos.

Respecto a estos resultados, se analizan los textos mediante el software de gestión bibliográfica Mendeley y se verifica si hay duplicidad, obteniendo un total de 4 artículos repetidos para el período comprendido entre 2000-2010, quedando un total de 17 artículos y para el segundo período se encontraron 65 artículos repetidos, obteniendo como resultado un total de 100 artículos para este período. Analizando los resultados, se puede evidenciar que el tema es de interés en el tiempo, en

particular por la investigación de la actividad probiótica del género *Bacillus* sp como modulador de la microbiota intestinal de los pollos de engorde.

Posterior a la eliminación de duplicados, quedaron en total de 117 publicaciones comprendidas entre los años 2000-2021, que se incluyeron en la revisión sistemática.

En resumen, la información presentada en las tablas anteriores se puede observar de manera gráfica a continuación:

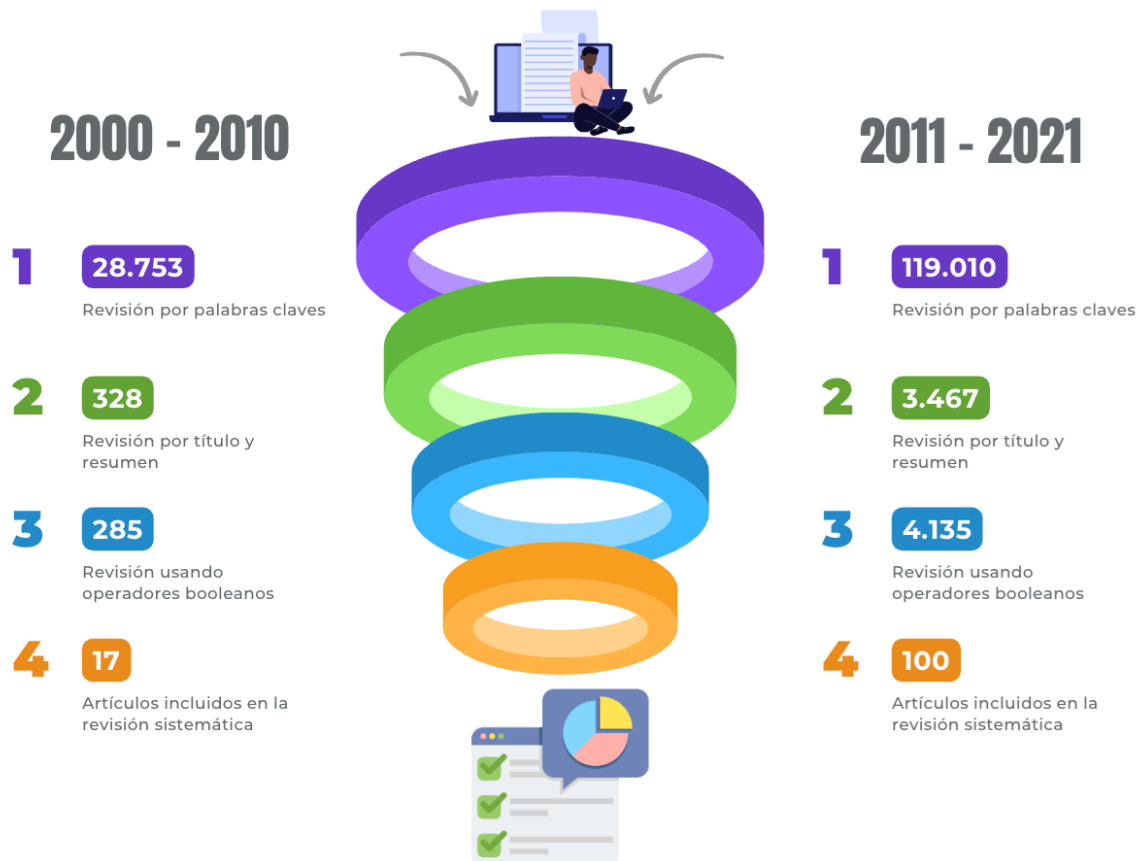


Figura 14. Aplicación del diseño metodológico. Fuente: figura propia.

De los 17 artículos para el período comprendido entre 2000-2010, el 29% (n=5) corresponde a investigaciones realizadas en América; 29% (n=5) en Asia; 29% (n=5) en Europa; y 12 % (n=2) en África.

Para el período comprendido entre 2011-2021, el 53% (n=53) corresponde a investigaciones realizadas en Asia; 22% (n=22) en América; 14% (n=14) en Europa; 7% (n=7) en África y 4% (n=4) en Oceanía (Figura 15), siendo China (n=40) el país con el mayor número de investigaciones. En este periodo, de las 22 publicaciones de

América, 6 corresponden a Latino América, de las cuales una es para Colombia y las otras para Costa Rica y México un documento respectivamente, mientras que para Brasil se encontraron 3 publicaciones.

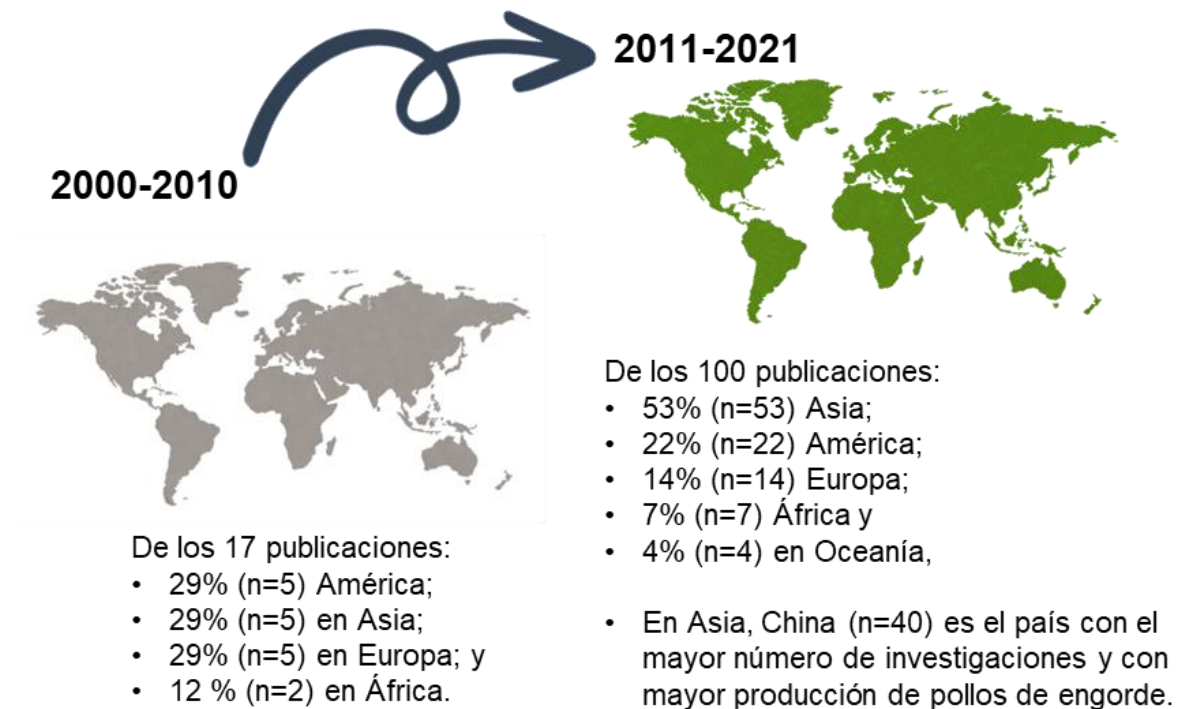


Figura 15. Comparación de publicaciones por continentes entre los dos períodos. Fuente: figura propia.

Lo anterior demuestra que la mayoría de los estudios proceden de Asia, principalmente de China, esto se puede relacionar a que este país junto a EE. UU son potencia en la producción de carne de pollo en la actualidad. En la revisión se notó que países como Estados Unidos y Brasil que se consolidan como uno de los mayores productores de carne de pollo no tenían tantas publicaciones sobre investigaciones realizadas en este sector.

A partir de los artículos seleccionados, se puede evidenciar que las publicaciones a partir del 2017 presentaron un incremento. Esto se puede correlacionar con el crecimiento que tuvo la producción y consumo de este tipo de carne comparado con los diez años previos (Figura 16). De acuerdo con datos de Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA), entre 2008 y 2018 la producción de carne de pollo tuvo un crecimiento promedio anual de 2.7%.

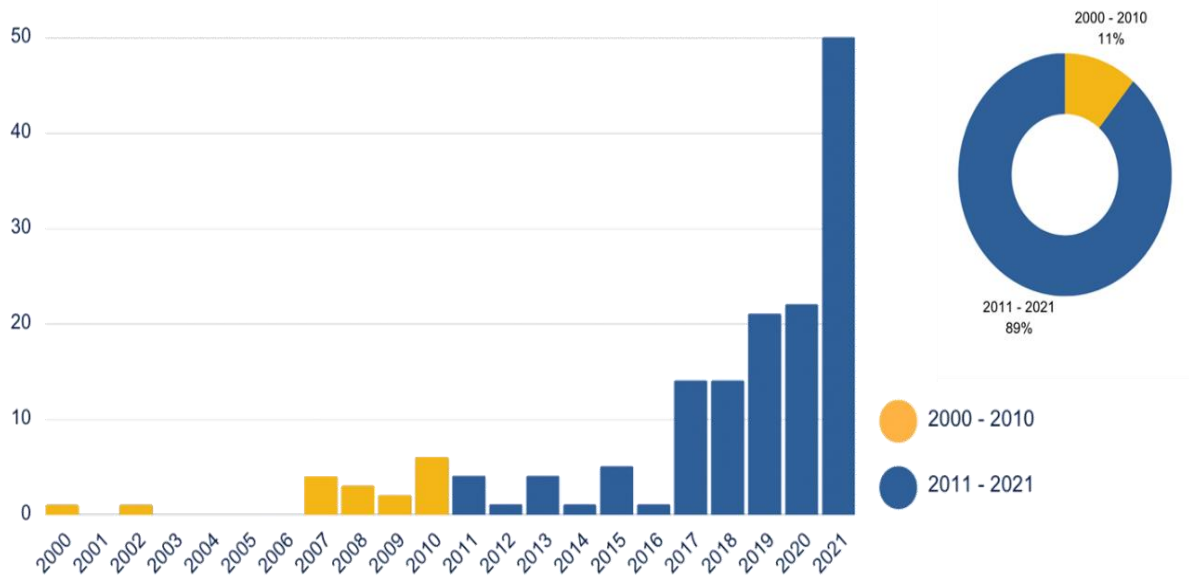


Figura 16. Número de publicaciones por año. Fuente: figura propia.

En cuanto al tipo de publicación se encontró que, de las 117 publicaciones incluidas, el 78% (n=91) corresponde a publicaciones de tipo experimental; 19% (n=22) artículos de revisión, 1% (n=1) tesis y 2% (n=3) capítulo de libro (Figura 17). Con relación al idioma, el 100% de las publicaciones incluidas están en idioma inglés.

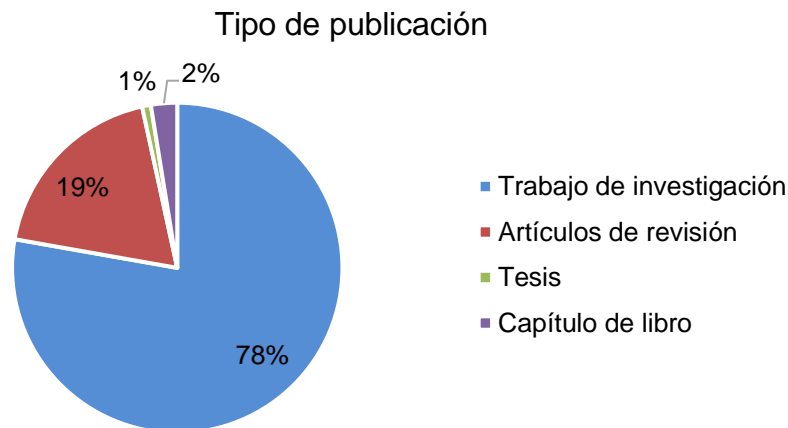


Figura 17. Tipo de publicación incluida en el estudio. Fuente: figura propia.

Como se ha mencionado, el sector avícola en las últimas décadas ha presentado un crecimiento acelerado, esto se debe principalmente a la tecnificación de los procesos que ha implementado esta industria. Según datos de la FAO, la carne de pollo

representó para el 2020 casi el 40% de la producción de la carne a nivel mundial (68). Con el objetivo de cumplir con la demanda, el sector industrial ha utilizado un gran número de productos químicos, cuya función es acelerar el crecimiento del ave, en este caso los pollos de engorde. El uso indiscriminado de sustancias antibióticas como la clortetraciclina (69), que favorecen el proceso del crecimiento del animal y protección frente a patógenos, lo cual trae consecuencias a largo plazo para la salud del animal y el consumidor.

En este sentido, el uso de probióticos se ha visto como una alternativa amigable con el ambiente, la salud humana y animal teniendo en cuenta el concepto de *One Health* “Una salud” que promueve la, OMS, FAO, OIE, UNICEF(70), siendo fundamental establecer una regulación del uso de microorganismos como probióticos para garantizar la salud del animal y del consumidor. En el caso de Europa, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), autoriza el uso de la cepa *Bacillus licheniformis* DSM 28710 como aditivo utilizado en pollos de engorde, aclarando que se ha verificado que no presenta ningún riesgo para la salud animal, humana y ambiental (71).

Para el caso de América, las entidades oficiales como USDA, el Servicio de Seguridad e Inspección Alimentaria (FSIS) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) establecen directrices para el uso de probióticos en humanos y animales. Respecto a *Bacillus* spp, la FDA en el 2012 aprobó el uso de *Bacillus cereus* variant *toyoi*, en pollos de engorde (72).

En Colombia se han elaborado algunas resoluciones o decretos como el decreto 3518 de 2006, la resolución 1515 de 2015, resolución 3652 de 2014, resolución 1382 de 2013 y la resolución 1966 de 1984, con el objetivo primordial de cumplir con las BPM en la industria animal y garantizar la salud, sin embargo, a nivel mundial se debe regular de manera más estricta la aplicación de probióticos en la industria avícola.

Género *Bacillus* spp utilizado como probiótico

De acuerdo con la información revisada se encontró que los siguientes *Bacillus* son utilizados como probióticos en la avicultura se detallan en la tabla 12 (73–75).

Tabla 12. Especies de *Bacillus* spp utilizadas como probiótico comerciales en la avicultura.

Probióticos a base de <i>Bacillus</i>	Fabricante	Especie	Nomenclatura cepa comercial	Referencia
ALTERION NE®	Adissec/Novozymes	<i>B. subtilis</i>	DSMZ 29784	(76)
B-Act	Huvepharma	<i>B. licheniformis</i>	DSM 28710	(77)
Calsporin®	ORFFA	<i>B. velezensis</i>	DSM 15544	(78)
CLOSTAT™	Kemin	<i>B. subtilis</i>	PB6	(79)
GALLIPRO®	CHR hansen	<i>B. subtilis</i>	DSM17299	(80,81)
MAX				
SPORULIN®	NOVUS®	<i>B. subtilis</i>	Desconocido	(82)

Debido a las características que ha mostrado tener *Bacillus* spp como probiótico, la investigación con este género no se ha detenido. En la actualidad, se conocen estudios que resaltan las propiedades de este género como probióticos tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo cual, la avicultura avanza rápidamente hacia el uso de probióticos a base de este microorganismo, principalmente debido a su fácil obtención y manipulación.

La mayoría de los probióticos comerciales de *Bacillus* consisten en *B. subtilis*, *B. clausii*, algunos *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. pumilus*, *B. amyloquefaciens* y *B. licheniformis* (Tabla 13)

Tabla 13. Características de algunas especies de *Bacillus* spp

Especie	Características	Referencia
<i>B. amyloquefaciens</i>	Se encuentra de manera ubicua en alimentos, plantas, animales, suelo y en diferentes ambientes.	(83)
<i>B. clausii</i>	Las cepas se utilizan como probióticos principalmente debido a sus propiedades inmunomoduladoras y antimicrobianas.	(84)
<i>B. coagulans</i>	Produce ácido láctico. la temperatura óptima de crecimiento para <i>B. coagulans</i> es de 35 a 50 °C y el pH óptimo de crecimiento es de 5,5 a 6,5.	(85)
<i>B. licheniformis</i>	Se encuentra principalmente en el suelo y las plantas, Las cepas de <i>B. licheniformis</i> se han utilizado principalmente como probióticos de tipo combinado con <i>B. subtilis</i> .	(86)
<i>B. subtilis</i>	Secreta numerosas enzimas para degradar una variedad de sustratos.	(87)

Con relación a la información recopilada, se realizó una estimación de las especies de *Bacillus* spp que se han utilizado en la totalidad de los artículos para ambos períodos. Se evidenció que de 17 artículos para el período comprendido entre 2000

a 2010, la especie más utilizadas fue *Bacillus subtilis* correspondiente al 17,6% y 5,88% *Bacillus licheniformis*. Para este período los artículos fueron más de tipo revisión de literatura.

Para el segundo periodo comprendido entre el año 2011 y el año 2021 en correspondencia a 100 artículos, las especies empleadas en los estudios realizados fueron *Bacillus subtilis* con 67%, seguido por *Bacillus licheniformis* en un 13% , *Bacillus amyloliquefaciens* en un 12% y por último, *B. coagulans* con un 8% (Figura 18).

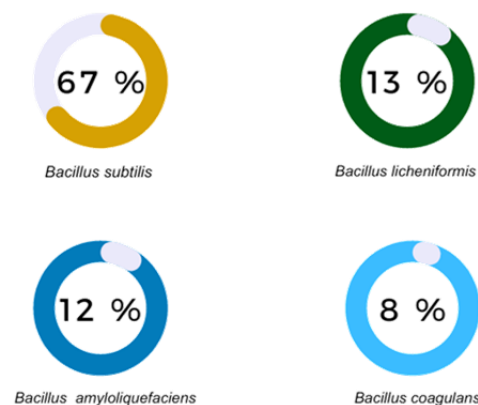


Figura 18. Frecuencia especies *Bacillus* spp. Fuente: figura propia.

Como se puede evidenciar en diferentes estudios, *Bacillus subtilis* es la especie más estudiada como probiótico y en particular se considera una de las especies más exitosas utilizadas en la alimentación de pollos de engorde (88–93).

Efectos del uso de probióticos del género *Bacillus* spp en pollos de engorde

El uso de *Bacillus* spp como probióticos en la producción pollos de engorde como se han mencionado abarca la aplicación de diferentes especies como *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. amyloquefaciens*, entre otras. El empleo del género *Bacillus* spp contribuye al favorecimiento del equilibrio de la microbiota, estimulación del sistema inmune y brinda una protección frente a enteropatógenos (figura 18). Además, se ha evidenciado que la suplementación con *Bacillus subtilis* influye en los cambios histomorfológicos de las vellosidades intestinales, esto favorece la absorción de nutrientes y por ende, el desarrollo adecuado del ave (94,95). De esta forma, se

obtienen pollos con mayor inmunocompetencia y mayor beneficio para el sector agrícola.

Se han realizado diversos estudios para evaluar los beneficios que tiene las diferentes especies de *Bacillus* spp, los cuales se mencionan a continuación:

Knap *et al*, (2010) en su estudio con *Bacillus licheniformis* y *Clostridium perfringens* como agente responsable de enteritis necrótica, se evaluó un grupo de aves alimentadas con adición de esporas de *Bacillus licheniformis* (DSM 17236) a diferentes dosis y otro con aves alimentadas con dietas que tenían niveles subterapéuticos de virginiamicina. Se evidenció que *B. licheniformis* se puede utilizar como una alternativa de adición a los alimentos para tratar la enteritis necrótica y por ende, reducir el uso de antimicrobianos (96).

De otro lado, Molnar *et al*, (2012) publicaron un estudio donde se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de *Bacillus subtilis*. En este estudio que se dividió en dos fases, la primera consistió en la alimentación de las aves y la segunda en el estudio histológico. Se observó que los pollos de engorde alimentados con *B. subtilis* presentaron un mayor peso y mayor eficiencia en la alimentación. Además, hubo un incremento en el tejido inmunológico (97), conclusión respaldada por otros estudios (98,99).

Tsungyu Hung *et al.*, (2012) evaluaron el efecto de *Bacillus coagulans* ATCC 7050. La dieta con *B. coagulans* tendió a aumentar la altura de las vellosidades, pero no tuvo ningún efecto sobre la profundidad de las criptas en el yeyuno. Se concluye que la alimentación con *B. coagulans* mejoró la tasa de conversión alimentaria, observándose mayor incremento de *Lactobacilli* y disminución de coliformes (100).

En un estudio realizado por Hong *et al.*, (2019), se evaluó el efecto de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* TL que se utilizó para alimentar a los pollos de engorde, frente a un grupo de pollos de engorde que recibieron el antibiótico clortetraciclina. Los resultados sugieren que la cepa probiótica *B. amyloliquefaciens* TL puede modular la microbiota cecal de pollos de engorde de manera similar a la clortetraciclina (101). Esto también se pudo evidenciar en un estudio realizado por Zhang *et al* con *B. coagulans* (102).

Rajput *et al.*, (2013) realizaron un estudio publicado en el con el objetivo de determinar el efector inmunomodulador, este se realizó con trescientos pollos de 1 día, divididos

en tres grupos. El primer grupo alimentado con dieta basal con virginiamicina, un segundo grupo alimentados con *Bacillus subtilis* B10 y un tercer grupo alimentados con *Saccharomyces boulardii* (Sb), durante 72 días. Los resultados que obtuvieron demostraron que *Bacillus subtilis* B10 y Sb aumentó las células positivas para IgA en la luz de las vellosidades intestinales y reveló que Sb y Bs podrían modular la ultraestructura intestinal mediante el aumento de los niveles de expresión de ARNm de oclusión, claudin2 y claudin3 en el intestino de pollo de engorde (95).

Otro estudio, realizado por Sathishkumar *et al.*, (2013), se investigó la influencia de la suplementación dietética de *B. subtilis* PB6 en el rendimiento, la histomorfometría de las vellosidades y la integridad intestinal contra la NE inducida por *C. perfringens* en pollos de engorde. En este estudio se observó que los pollos alimentados con esta cepa, tenían una mejor salud intestinal e integridad intestinal al aumentar la altura de las vellosidades y la proporción entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas (94).

Respecto a la maduración de la microbiota cecal, Muhammad *et al.*, (2021) los resultados de su estudio donde evaluaron el impacto de los probióticos *B. pumilus* y *B. subtilis* sobre la diversidad y madurez microbiana en términos de cambios en la composición de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae en la microbiota cecal en diferentes etapas de la vida en pollos de engorde. De acuerdo con los resultados de sus estudio, evidenciaron que *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* mejoraron la población estrictamente anaeróbica de la familia Ruminococcaceae en las primeras semanas de vida, que se considera una parte importante de la microbiota madura y tiene efectos beneficiosos sobre la fisiología del huésped (103).

Con relación al efecto protector de algunas especies de *Bacillus* spp, en una investigación realizada por Zhen *et al.*, (2018), la cual tenía como objetivo evaluar la eficacia de *Bacillus coagulans* en el control de la infección por *Salmonella enteritidis* (SE) en pollos de engorde mediante la determinación de sus efectos sobre el rendimiento del crecimiento, la población microbiana y las respuestas inmunitarias en pollos de engorde afectados por SE. Encontraron que esta especie tiene un efecto positivo en el desarrollo del pollo, lo anterior, puede deberse a que *B. coagulans* produce ciertas enzimas como amilasa, proteasa y lipasa, entre otras, favoreciendo la digestión de los alimentos. Además, se evidenció que los pollos alimentados con

esta especie presentaron una mejor salud intestinal y un mayor control de la infección causada por *SE*. Por lo anterior, en el estudio se concluye que la suplementación con *B. coagulans* tiene efecto positivo para mantener la salud intestinal y controlar la infección por *SE*, además, de favorecer inmunomodulación en la mucosa intestinal (104).

En la figura 19 se especifican algunos de los efectos positivos de *Bacillus* spp en pollos de engorde.

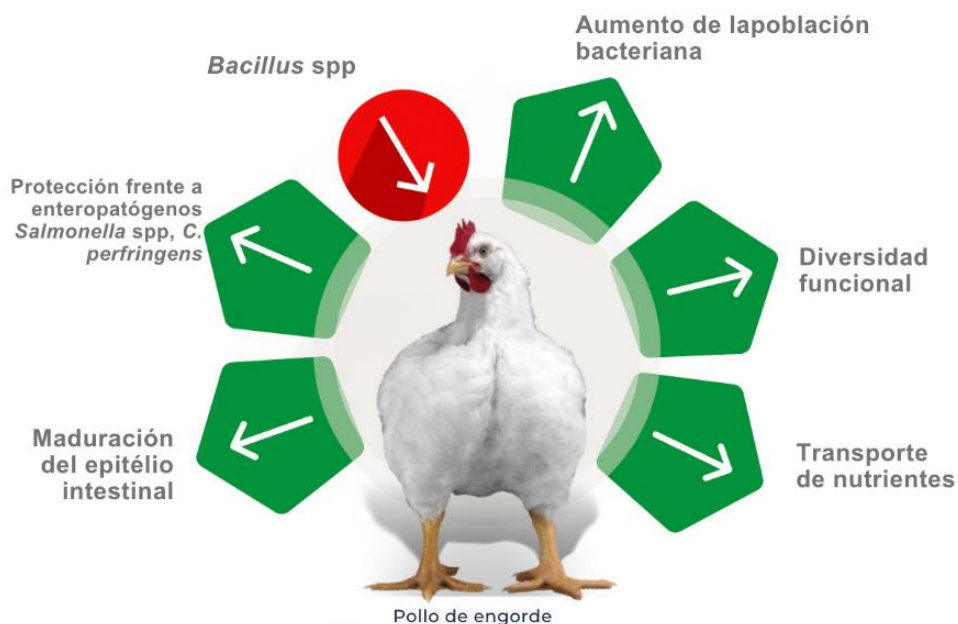


Figura 19. Pollo Ross 308AP (63). Efectos positivos de *Bacillus* spp. Fuente: figura propia.

Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción de los probióticos a base de *Bacillus* spp no han sido aclarados por completo, pero de acuerdo con los estudios revisados, los mecanismos de acción que se evidencian son (figura 20): la exclusión de patógenos por competitividad, la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana, estimulación del sistema inmunológico y el mejoramiento de la digestión (75).

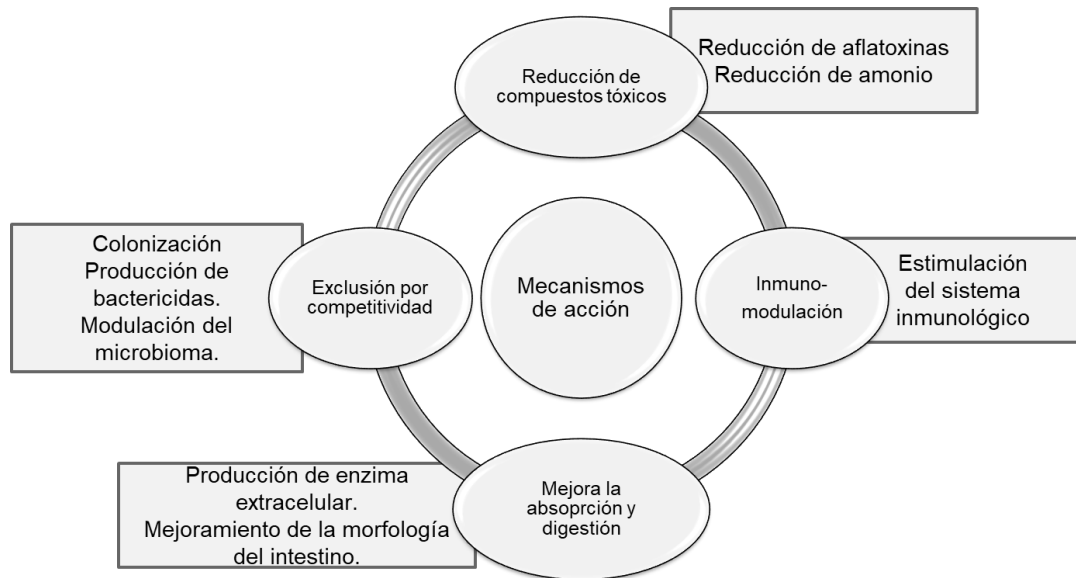


Figura 20. Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. Tomado y traducido de: (75)

Exclusión de patógenos por competitividad:

La evidencia de adherencia a las células epiteliales por parte de *Bacillus* spp. se ha demostrado principalmente *in vitro*. El consenso es que este género de bacterias es más transitorio en la naturaleza en comparación con *Lactobacillus* spp. La persistencia de *Bacillus* spp en el TGI podría ser atribuible a la formación de biopelículas que ayudan a adherirse al epitelio intestinal, aumentando así su persistencia en la mucosa intestinal y prevención de la colonización por enteropatógenos(75,105). Otro mecanismo para evitar la colonización de enteropatógenos, se debe a la capacidad una variedad de péptidos antimicrobianos como lipopéptidos, surfactinas y bacteriocinas(43,44,106).

Inhibición de adhesión de patógenos.



Figura 21. Mecanismo exclusión por competitividad. Fuente: figura propia.

Reducción de compuestos tóxicos:

B. subtilis produce subtilina, que puede reducir la microbiota generadora de ureasa en el lumen gastrointestinal atenuando así la liberación de amoníaco. Por otra parte, otro mecanismo utilizado puede ser el consumo de amoníaco como metabolito lo que evita que surja una toxicidad excesiva por amoníaco (75,81).

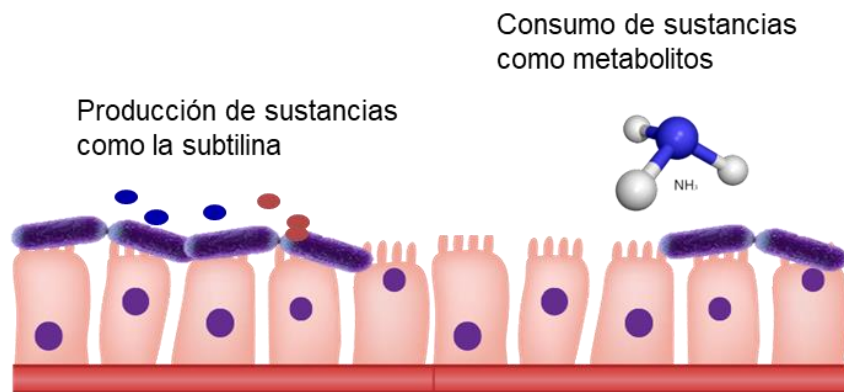


Figura 22. Mecanismo para reducir compuestos tóxicos. Fuente: figura propia.

Estimulación del sistema inmunológico:

Hay evidencia que sugiere un papel de *B. subtilis* en la estimulación de la respuesta sIgA que es necesaria para inmunidad contra patógenos de las mucosas. Además, se ha reportado que *B. subtilis* aumentó las transcripciones de IL1 β , IL12 e IFN γ en el intestino(107–109). Se ha reportado también que *Bacillus* spp mejoró el desarrollo del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) al aumentar el número de linfocitos intraepiteliales y células productoras de inmunoglobulina(110).

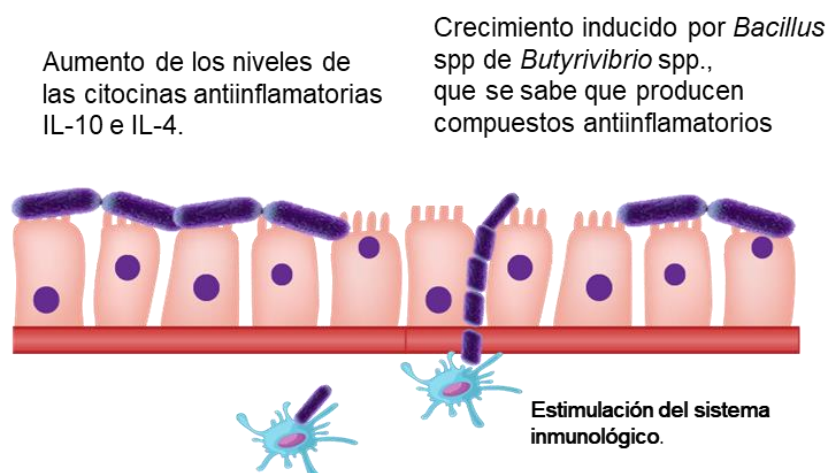


Figura 23. Mecanismo de inmunomodulación. Fuente: figura propia.

Mejoramiento de la digestión:

Alguna especies de *Bacillus* spp se caracterizan por producir enzimas exógenas como α -amilasa, β -glucanasa (111), xilanas(112), proteasa, fitasa, lipasa y celulasa que son importantes en la degradación de moléculas complejas a sencillas, lo que resulta en el aumento de la disponibilidad de aparente energía metabolizable. La morfología intestinal representa un papel importante para la captación de nutrientes y gozar de buena salud. Las vellosidades intestinales es directamente proporcional al radio de absorción, por lo que mejorar su morfología mejorará la absorción de nutrientes, resultados que se han evidenciado con diferentes cepas de *Bacillus* spp en diferentes estudios realizados (113–115).

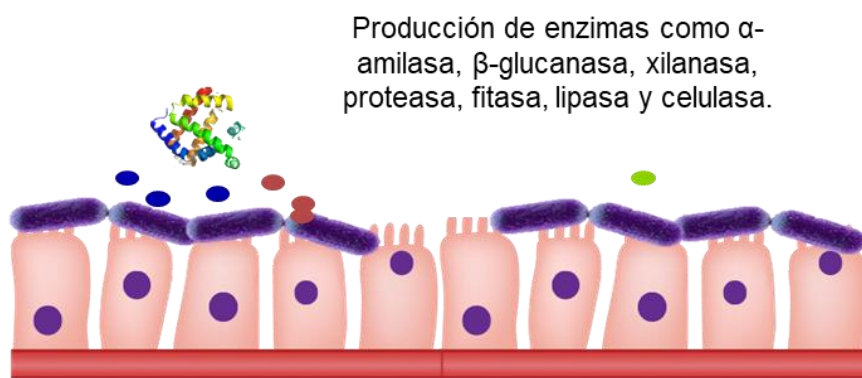


Figura 24. Mecanismo para mejorar la digestión. Fuente: figura propia.

A partir de esto, se ha demostrado que los mecanismos por el cual *Bacillus* spp puede modular la microbiota intestinal de los pollos es muy diverso, siendo algunos de estos conocidos a detalles, mientras que, en otros falta investigar a profundidad. Por otro lado, es importante mencionar que los mecanismos de acción no son mutuamente excluyentes, ya que *Bacillus* o cualquier otro probiótico pueden tener uno o varios mecanismos de acción. Respecto a esto, no hay mucha literatura disponible sobre los mecanismos directos de acción, sin embargo, hay una cantidad significativa de investigación que muestra la mejora del crecimiento y la salud en animales en lo que se ha estudiado(116–118), quedando mucho por investigar.

Otros efectos del uso de probióticos del género *Bacillus* spp en producción de pollos de engorde

Como se ha evidenciado, las investigaciones realizadas han tratado de maximizar la salud y el rendimiento de los pollos de engorde utilizando probióticos comerciales en el alimento. En la actualidad, se está buscando utilizar estos probióticos no solo en los pollos de engordes adultos, sino en huevos fértiles para incubar y, por lo tanto, exponer a las aves antes a las bacterias beneficiosas. Para esto, se han realizado ensayos con cepas específicas de *B. subtilis* sin resultados favorables.

En este sentido, en un estudio realizado por Castañeda *et al*, (2021), se evaluó la cepa de *B. subtilis* ATCC 6051 y se evidenció que el tratamiento con esta cepa afectó la incubabilidad, el rendimiento a los 21 días y la microbiota intestinal (119).

En otro estudio, publicado por Triplete *et al* (2018), se estudió la cepa de *B. subtilis* ATCC 6051 donde se determinó que no debía utilizarse para la inyección *in ovo* de huevos para incubación de reproductoras de pollos de engorde, porque afecta negativamente a casi todas las facetas de la incubabilidad (120).

Como se observa, lo encontrado no tiene nada que ver con el uso de este género como probiótico en animales y por lo tanto, de acuerdo con esta revisión no existen efectos adversos en el uso de *Bacillus* como probiótico en pollos de engorde.

Finalmente, no existen investigaciones que evidencien algún efecto en el humano por consumir pollos de engorde que hayan recibido probióticos. Sin embargo, es pertinente investigar y regular el uso de probióticos a base de *Bacillus* spp a nivel mundial en pollos de engordes por la posibilidad que tienen algunas especies de este género de producir toxinas (121), transferir genes de resistencia a los antimicrobianos y citotoxicidad que en algún momento podrían afectar al humano que lo consume (122) y que los organismos encargados de la regulación sanitaria, los profesionales que se dedican al sector y la academia, tengan como propósito común un trabajo conjunto enfocando esfuerzos para garantizar la salud del animal, la seguridad alimentaria y el desarrollo de este sector a nivel mundial.

7. Conclusiones

Con base en la revisión bibliográfica se concluye que:

1. La investigación documental sobre el uso del género *Bacillus* spp como probiótico realizada en este estudio evidencia que es una buena alternativa para modular la microbiota intestinal en pollos de engorde y que está siendo utilizada en todo el mundo. Si bien, existen muchos más estudios en los países de mayor producción, en América Latina ya se están realizando estudios que con el tiempo llevarán a los avicultores a considerarla en el manejo de suplementación alimentaria alternativa para la producción.
2. Un gran número de estos documentos son de Asia, y, China es el país con el mayor número de publicaciones, lo cual se puede correlacionar con el hecho de que es el mayor productor de carne de pollo a nivel mundial.
3. La especie que más se ha estudiado con actividad probiótica en pollos de engorde es *B. subtilis*, que también es la especie más estudiada a nivel industrial por los efectos que ha demostrado tener.
4. Las cepas probióticas de *Bacillus* encontradas en esta revisión y reportadas por los investigadores fueron *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. licheniformis* , *B. pumilus* y *B. subtilis*. Estas cepas tienen propiedades antimicrobianas, antioxidantes y de producción de metabolitos.
5. El empleo del género *Bacillus* spp contribuye al favorecimiento del equilibrio de la microbiota, mejor desempeño productivo e inmunocompetencia brindando una protección frente a microorganismos con potencial patógeno.

8. Recomendaciones

Se requiere mayor investigación científica sobre las cepas de *Bacillus* que se utilicen como probióticos para conocer si pudieran generar un efecto inesperado en sus mecanismos de acción relacionado con producción de toxinas, resistencia a los antimicrobianos o la producción de amina biogénica (BA), y de esa manera minimizar los riesgos para el animal y para el consumidor. Se podrían utilizar estrategias moleculares como la proteómica y la meta transcriptómica para ampliar el conocimiento.

Es necesario establecer políticas y otras normativas que regulen el uso de las cepas probióticas en esta industria, especificando concentración recomendada de administración y otros aspectos necesarios para el manejo y uso de estos agentes biológicos debido a que la normativa a nivel nacional no es muy amplia y las implicaciones que estas cepas pueden desencadenar como reacciones inespecíficas aún no parecen estar determinadas.

Referencias

1. R. FULLE. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 1989;365–78.
2. Butel MJ. Probiotics, gut microbiota and health. *Med Mal Infect* [Internet]. 2014;44(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2013.10.002>
3. Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of Action of Probiotics. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>.
4. FAO E, OMS E. Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. *Estud FAO Aliment y Nutr* [Internet]. 2006;85:52. Available from: <file:///C:/Users/Acer/Documents/paty/homework1/PROBIOTICOS OPS 2006.pdf>
5. Rama EN, Singh M. Regulations in Poultry Meat Processing. *Food Saf Poult Meat Prod.* 2019;293–301.
6. FENAVI. ¿Qué le espera a la avicultura en el 2022? *Avicultores* [Internet]. 2022;(287):1–52. Available from: <https://fenavi.org/wp-content/uploads/2022/03/revista-287.pdf>
7. Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Shafi ME, Qattan SYA, Batiha GE, Khafaga AF, et al. Probiotics in poultry feed: A comprehensive review. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2020 Nov 1;104(6):1835–50.
8. Shang Y, Kumar S, Oakley B, Kim WK. Chicken Gut Microbiota: Importance and Detection Technology. *Chick Gut Microbiota Importance Detect Technol Front Vet Sci* [Internet]. 2018;5:254. Available from: www.frontiersin.org
9. Jha R, Das R, Oak S, Mishra P. animals Probiotics (Direct-Fed Microbials) in Poultry Nutrition and Their Effects on Nutrient Utilization, Growth and Laying Performance, and Gut Health: A Systematic Review. [cited 2022 Jun 11]; Available from: www.mdpi.com/journal/animals
10. Zalewska M, Błażejewska A, Czapko A, Popowska M. Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Animal Manure – Consequences of Its Application in Agriculture. *Front Microbiol.* 2021 Mar 29;12:640.
11. Ezema. Probiotics in animal production: A review. *J Vet Med Anim Heal.* 2013;5(11):308–16.
12. Sánchez Franco EC, Borja Bravo M, Ávila Ramos F. Hábitos de consumo de carne de pollo en Guanajuato, México. *Verano la Cienc* [Internet]. 2021;10:2–3. Available from: <http://repositorio.ugto.mx/bitstream/20.500.12059/6371/1/Hábitos de consumo de carne de pollo en Guanajuato%2C México.pdf>

13. Sector avícola colombiano evidencia un crecimiento del 2,9% al finalizar este 2022 - aviNews, la revista global de avicultura [Internet]. [cited 2023 Jun 5]. Available from: <https://avinews.com/sector-avicola-colombiano-evidencia-un-crecimiento-del-29-al-finalizar-este-2022/>
14. Decreto 3518 de 2006 [Internet]. [cited 2023 Jan 28]. Available from: https://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/resolucion_ica_1515_2015.htm
15. Resolución 1515 de 2015 [Internet]. [cited 2023 Jan 28]. Available from: https://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/decreto_3518_2006.htm
16. Resolución 3652 de 2014 [Internet]. [cited 2023 Jan 28]. Available from: https://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/resolucion_ica_3652_2014.htm
17. Resolución 1382 de 2013 [Internet]. [cited 2023 Jan 28]. Available from: https://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/resolucion_minsaludps_1382_2013.htm
18. Resolución 1966 de 1984 - FENAVI - Federación Nacional de Avicultores de Colombia [Internet]. [cited 2023 Jan 28]. Available from: <https://fenavi.org/documentos/resolucion-1966-de-1984/>
19. INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Resolución 061252 Del 2020. Vol. 0, Instituto Colombiano Agropecuario. 2020. p. 9–28.
20. Rural M de A y D, Ministerio de Ambiente V y DT, Ministerio de Comercio I y T, Público M de H y C, Socia M de P. CONPES 3468 POLÍTICA NACIONAL DE SANIDAD E INOCUIDAD PARA LA CADENA AVÍCOLA. 2007;
21. Barkhidarian B, Roldos L, Iskandar MM, Saedisomeolia A, Kubow S. Probiotic Supplementation and Micronutrient Status in Healthy Subjects: A Systematic Review of Clinical Trials. 2021; Available from: <https://doi.org/10.3390/nu13093001>
22. Khosravi A, Mazmanian SK. Disruption of the gut microbiome as a risk factor for microbial infections.
23. Clavijo V, Morales T, Vives-Flores MJ, Reyes Muñoz A. The gut microbiota of chickens in a commercial farm treated with a Salmonella phage cocktail. 123AD; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04679-6>
24. Castillo NA, de Moreno de LeBlanc A, Galdeano CM, Perdigón G. Probiotics: An alternative strategy for combating salmonellosis. Immune mechanisms involved. Food Res Int [Internet]. 2012;45(2):831–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.031>
25. Baldwin S, Hughes RJ, Hao Van T, Moore RJ, Stanley D. At-hatch administration of probiotic to chickens can introduce permanent and beneficial changes in gut microbiota Running Title: Early administration of probiotics.
26. Zhao Y, Zeng Y, Zeng D, Wang H, Sun N, Xin J, et al. Dietary Probiotic

Supplementation Suppresses Subclinical Necrotic Enteritis in Broiler Chickens in a Microbiota-Dependent Manner. *Front Immunol.* 2022;13(March):1–18.

27. Fijan S. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *Int J Environ Res Public Heal* [Internet]. 2014;11:4745–67. Available from: www.mdpi.com/journal/ijerph
28. Nava J. Evaluación de Bacterias Ácido Lácticas Comercializadas como Probióticas. *Univ los Andes Dep Biol.* 2008;15–6.
29. Rondon L, Añez M, Salvatierra A, Meneses R, Heredia M. Guías De Manejo Clínico: Consenso De Probióticos [Internet]. Vol. 78, Archivos venezolanos de la puericultura y pediatría. 2015. Available from: <http://ve.scielo.org/pdf/avpp/v78n4/art06.pdf>
30. Milián G., Pérez M., Bocourt R. Empleo de probióticos basado en *Bacillus* sp y de sus endosporas en la producción avícola. *Rev Cuba Cienc Agrícola.* 2008;42(2):117-122pp.
31. Amara AA, Shibl A. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharm J* [Internet]. 2015;23(2):107–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2013.07.001>
32. Abul M, Azad K, Sarker M, Li T, Yin J. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/9478630>
33. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy N. role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2015;21(29):8787–803. Available from: <http://www.wjgnet.com/esps/HelpDesk>:<http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspx:8787-8803> Available from: URL:<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i29/8787.htm> DOI:<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
34. Gao P, Ma C, Sun Z, Wang L, Huang S, Su X, et al. Feed-additive probiotics accelerate yet antibiotics delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken. *Microbiome.* 2017;5(1):91.
35. Nour MA, El-Hindawy MM, Abou-Kassem DE, Ashour EA, Abd El-Hack ME, Mahgoub S, et al. Productive performance, fertility and hatchability, blood indices and gut microbial load in laying quails as affected by two types of probiotic bacteria. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2021;28(11):6544–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.030>
36. Abdel-Moneim AME, Selim DA, Basuony HA, Sabic EM, Saleh AA, Ebeid TA. Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* spores on growth performance, oxidative status, and digestive enzyme activities in Japanese quail birds. *Trop Anim Health Prod.* 2020;52(2):671–80.
37. Claus D, Fritze D. DIETER CLAUS and DAGMAR FRITZE 2 1. 1989;5–6.

38. Maughan H, Van der Auwera G. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2011;11(5):789–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.001>
39. Morelli L, Maris S, Rivera R, Rokana N, Panwar H, Elshaghabee FMF, et al. *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. 2017; Available from: www.frontiersin.org
40. Realpe ME, Hernández CA, Agudelo CI. Species of the *Bacillus* strain: macroscopic and microscopic morphology. *Biomedica*. 2002;22(2):106–9.
41. Vos P De, Ledeganckstraat KL, B- G. Cohn 1872, 174. 2015.
42. Moscovici M, Tomulescu C, Băbeanu N. Antimicrobial compounds of the genus *Bacillus*: A review Bioprospection of Microorganisms View project Exopolysaccharides View project Roxana Stoica. 2019 [cited 2023 Mar 5]; Available from: <https://www.researchgate.net/publication/338398534>
43. Joseph B, Dhas B, Hena V, Raj J, Joseph D. Bacteriocin from *Bacillus subtilis* as a novel drug against diabetic foot ulcer bacterial pathogens *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Doc Head Asian Pac J Trop Biomed [Internet]. 2013 [cited 2023 Mar 5];3(12):942–6. Available from: www.elsevier.com/locate/apjtb
44. Abriouel H, Franz CMAP, Omar N Ben, Galvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2023 Mar 5];35(1):201–32. Available from: <https://academic.oup.com/femsre/article/35/1/201/513063>
45. Deleu M, Paquot M, Nylander T. Effect of Fengycin, a Lipopeptide Produced by *Bacillus subtilis*, on Model Biomembranes. *Biophys J*. 2008 Apr 1;94(7):2667–79.
46. Li Y, Héloir MC, Zhang X, Geissler M, Trouvelot S, Jacquens L, et al. Surfactin and fengycin contribute to the protection of a *Bacillus subtilis* strain against grape downy mildew by both direct effect and defence stimulation. *Mol Plant Pathol* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2023 Mar 5];20(8):1037. Available from: [/pmc/articles/PMC6640177/](https://pmc/articles/PMC6640177/)
47. Alberto Moreira-Filho C, Reva O, Leonidas Chikindas M, Danilova I, Sharipova M. The Practical Potential of Bacilli and Their Enzymes for Industrial Production. *Front Microbiol* | www.frontiersin.org [Internet]. 2020;1:1782. Available from: www.frontiersin.org
48. Peng Y, Yang XJ, Xiao L, Zhang YZ. Cloning and expression of a fibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) gene from *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol*. 2004;155(3):167–73.
49. Contesini FJ, Melo RR de, Sato HH. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Crit Rev Biotechnol* [Internet]. 2018;38(3):321–34.

Available from: <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>

50. Gao Z, Wu H, Shi L, Zhang X, Sheng R, Yin F, et al. Study of *Bacillus subtilis* on growth performance, nutrition metabolism and intestinal microflora of 1 to 42 d broiler chickens. *Anim Nutr* [Internet]. 2017;3(2):109–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2017.02.002>
51. Elshaghabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H. *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. *Front Microbiol*. 2017 Aug 10;8(AUG):1490.
52. Turner P V. The role of the gut microbiota on animal model reproducibility. *Anim Model Exp Med*. 2018;1(2):109–15.
53. Pourabedin M, Zhao X. Prebiotics and gut microbiota in chickens. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2023 Mar 18];362(15). Available from: https://www.researchgate.net/publication/280447632_Prebiotics_and_gut_microbiota_in_chickens
54. Kers JG, de Oliveira JE, Fischer EAJ, Tersteeg-Zijderveld MHG, Konstanti P, Stegeman JA, et al. Associations between phenotypic characteristics and clinical parameters of broilers and intestinal microbial development throughout a production cycle: A field study. *Microbiologyopen* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2023 Jun 5];9(11):e11114. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mbo3.1114>
55. MONDAL A, DE K, JOARDAR SN. Gut microbiota modulation for enhanced poultry production. *Indian J Anim Heal*. 2020;59(2-Spl):128–37.
56. Yeoman CJ, Chia N, Jeraldo P, Sipos M, Goldenfeld ND, White BA. The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Anim Health Res Rev*. 2012;13(1):89–99.
57. Svihus B. Function of the digestive system. *J Appl Poult Res*. 2014;23(2):306–14.
58. Board AS. U . S . Broiler. 2002;(Chart 6).
59. Reading F. POULTRY Contents. 1998;331–2.
60. Fenavi. Aspectos Productivos Y Administrativos En La Industria Avícola. FenaviOrg [Internet]. 2019;148:56. Available from: <https://fenavi.org/wp-content/uploads/2019/02/ASPECTOS-PRODUCTIVOS-Y-ADMINISTRATIVOS-EN-LA-INDUSTRIA-AVÍCOLA.pdf>
61. Poultry. [consultado el 12 de julio de 2022]. Disponible en: <https://avicultura.poultry.com/productos/cobb-espanola/cobb500>
62. Colaves. Pollos COBB 500. [Internet]. Disponible en: <https://colaves.com/project/pollos-cobb-de-engorde/>

63. Ross (An Aviagen Brand). [Internet]. Disponible en:<https://es.aviagen.com/brands/ross/products/ross-308>
64. El sitio avicola. [Internet]. Disponible en: <https://www.elsitioavicola.com/>
65. Gyles CL. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Anim Heal Res Rev* [Internet]. 2008 [cited 2023 Mar 8];9(2):149–58. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/animal-health-research-reviews/article/abs/antimicrobial-resistance-in-selected-bacteria-from-poultry/FE9AEBAB733DB758D17E0A35FFEF062>
66. Nhung NT, Chansiripornchai N, Carrique-Mas JJ. Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: A review. *Front Vet Sci*. 2017 Aug 10;4(AUG):126.
67. Cosby DE, Cox NA, Harrison MA, Wilson JL, Jeff Buhr R, Fedorka-Cray PJ. Salmonella and antimicrobial resistance in broilers: A review. *J Appl Poult Res*. 2015 Sep 1;24(3):408–26.
68. FAO. Producción | Producción y productos avícolas | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [Internet]. [cited 2023 Feb 12]. Available from: <https://www.fao.org/poultry-production-products/production/es/>
69. Li B, Zhang J qiu, Han X gan, Wang Z lei, Xu Y yuan, Miao J feng. *Macleaya cordata* helps improve the growth-promoting effect of chlortetracycline on broiler chickens. *J Zhejiang Univ Sci B* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2023 Mar 14];19(10):776–84. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1631/jzus.B1700435>
70. Mackenzie JS, Jeggo M. The One Health Approach—Why Is It So Important? *Trop Med Infect Dis* [Internet]. 2019 May 31 [cited 2023 Mar 5];4(2). Available from: [/pmc/articles/PMC6630404/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31230404/)
71. Diario Oficial de la Unión Europea. REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2017/ 1904 DE LA COMISIÓN - de 18 de octubre de 2017 - relativo a la autorización de un preparado de *Bacillus licheniformis* DSM 28710 como aditivo en la alimentación de pollos de engorde y de pollitas criadas para puesta (titu. 2017 [cited 2023 Feb 12]; Available from: <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/evaluation-reports>
72. Matulka RA. Standard Operating Procedures for Administration of GRAS Notices. 2012;
73. Cutting SM. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol* [Internet]. 2011;28(2):214–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>
74. Lee N-KK, Kim W-SS, Paik H-DD. *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Sci Biotechnol* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2023 Mar 8];28(5):1297–305. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10068-019-00691-9>

75. Ramlucken U, Laloo R, Roets Y, Moonsamy G, van Rensburg CJ, Thantsha MS. Advantages of *Bacillus*-based probiotics in poultry production. *Livest Sci* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2023 Feb 12];241(August):104215. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104215>
76. Rychen G, Aquilina G, Azimonti G, Bampidis V, Bastos MDL, Bories G, et al. Safety and efficacy of Alterion NE® (*Bacillus subtilis* DSM 29784) as a feed additive for minor poultry species for fattening and reared for laying. *EFSA J* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2023 Feb 12];16(3):5204. Available from: [/pmc/articles/PMC7009566/](https://pmc/articles/PMC7009566/)
77. Rychen G, Aquilina G, Azimonti G, Bampidis V, De M, Bastos L, et al. Safety and efficacy of B-Act® (*Bacillus licheniformis* DSM 28710) for chickens for fattening and chickens reared for laying. *EFSA J* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2023 Feb 12];14(11):e04615. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2016.4615>
78. Bampidis V, Azimonti G, Bastos M de L, Christensen H, Dusemund B, Kouba M, et al. Safety and efficacy of Calsporin® (*Bacillus subtilis* DSM 15544) for all poultry species. *EFSA J*. 2019 Mar 1;17(3).
79. Teo AYL, Tan HM. Effect of *Bacillus subtilis* PB6 (CloSTAT) on Broilers Infected with a Pathogenic Strain of *Escherichia coli*. *J Appl Poult Res*. 2006 Jul 1;15(2):229–35.
80. Zaghari M, Zahroojian N, Riahi M, Parhizkar S. Effect of *Bacillus subtilis* spore (GalliPro®) nutrients equivalency value on broiler chicken performance. *Ital J Anim Sci* [Internet]. 2015 [cited 2023 Jan 11];14(1):94–8. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4081/ijas.2015.3555>
81. Upadhaya SD, Rudeaux F, Kim IH. Effects of inclusion of *Bacillus subtilis* (Gallipro) to energy- and protein-reduced diet on growth performance, nutrient digestibility, and meat quality and gas emission in broilers. *Poult Sci*. 2019 May 1;98(5):2169–78.
82. Wang WC, Yan FF, Hu JY, Amen OA, Cheng HW. Supplementation of *Bacillus subtilis*-based probiotic reduces heat stress-related behaviors and inflammatory response in broiler chickens. *J Anim Sci*. 2018 May 4;96(5):1654–66.
83. Woldemariamyohannes K, Wan Z, Yu Q, Li H, Wei X, Liu Y, et al. Prebiotic, Probiotic, Antimicrobial, and Functional Food Applications of *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2020 Dec 16 [cited 2023 Mar 13];68(50):14709–27. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.0c06396>
84. Marseglia GL, Tosca M, Cirillo I, Licari A, Leone M, Marseglia A, et al. Efficacy of *Bacillus clausii* spores in the prevention of recurrent respiratory infections in children: a pilot study. *Ther Clin Risk Manag* [Internet]. 2007 [cited 2023 Mar 13];3(1):13–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18360611/>

85. Konuray G, Erginkaya Z. Potential Use of *Bacillus coagulans* in the Food Industry. *Foods* 2018, Vol 7, Page 92 [Internet]. 2018 Jun 13 [cited 2023 Mar 13];7(6):92. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/7/6/92/htm>
86. Lee NK, Kim WS, Paik HD. *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Sci Biotechnol* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2023 Mar 8];28(5):1297–305. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10068-019-00691-9>
87. Su Y, Liu C, Fang H, Zhang D. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microb Cell Factories* 2020 191 [Internet]. 2020 Sep 3 [cited 2023 Mar 13];19(1):1–12. Available from: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-020-01436-8>
88. Lee KK. UARSB (USA). A and NRI, Lillehoj HS, Siragusa GR. Direct-fed microbials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens [Internet]. 2010 p. 106–14. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpsa/advpub/0/advpub_009096/_article/-char/ja/
89. Neveling DP, Dicks LMT. Probiotics: an Antibiotic Replacement Strategy for Healthy Broilers and Productive Rearing [Internet]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* Springer; Feb 1, 2021. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-020-09640-z>
90. Fazelnia K, Fakhraei J, Yarahmadi HM, Amini K. Dietary Supplementation of Potential Probiotics *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Saccharomyces cerevisiae* and Synbiotic Improves Growth Performance and Immune Responses by Modulation in Intestinal System in Broiler Chicks Challenged with Sal. *Probiotics Antimicrob Proteins* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2023 Jan 11];13(4):1081–92. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-020-09737-5>
91. Li CL, Wang J, Zhang HJ, Wu SG, Hui QR, Yang CB, et al. Intestinal morphologic and microbiota responses to dietary *Bacillus* spp. in a broiler chicken model. *Front Physiol* [Internet]. 2019 [cited 2023 Jan 11];10(JAN):1–18. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.01968/full>
92. Qiu K, Li C-LL, Wang J, Qi G-HH, Gao J, Zhang H-JJ, et al. Effects of Dietary Supplementation With *Bacillus subtilis*, as an Alternative to Antibiotics, on Growth Performance, Serum Immunity, and Intestinal Health in Broiler Chickens. 2021 Nov 29 [cited 2023 Jan 11];8:786878–786878. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2021.786878/full>
93. Sokale AO, Menconi A, Mathis GF, Lumpkins B, Sims MD, Whelan RA, et al. Effect of *Bacillus subtilis* DSM 32315 on the intestinal structural integrity and growth performance of broiler chickens under necrotic enteritis challenge. *Poult Sci*. 2019 Nov 1;98(11):5392–400.

94. Jayaraman S, Thangavel G, Kurian H, Mani R, Mukkalil R, Chirakkal H. *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Poult Sci*. 2013;92(2):370–4.
95. Rajput IR, Li LY, Xin X, Wu BB, Juan ZL, Cui ZW, et al. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. *Poult Sci* [Internet]. 2013 [cited 2023 Jan 11];92(4):956–65. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003257911938678X>
96. Knap I, Lund B, Kehlet AB, Hofacre C, Mathis G. *Bacillus licheniformis* prevents necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis*. 2010;54(2):931–5.
97. Molnár AK, Podmaniczky B, Kürti P, Tenk I, Glávits R, Virág G, et al. Effect of different concentrations of *Bacillus subtilis* on growth performance, carcass quality, gut microflora and immune response of broiler chickens. *Br Poult Sci* [Internet]. 2011 Dec [cited 2023 Jan 11];52(6):658–65. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00071668.2011.636029>
98. Kh H, Zh R, Musa Bodinga B, Hayat K, Liu X, Zhou J, et al. Effects of *Bacillus subtilis* DSM 32315 on Immunity, nutrient transporters and functional diversity of cecal microbiome of broiler chickens in necrotic enteritis challenge. *eprints.science-line.com* [Internet]. 2020 [cited 2023 Jan 11];10(3):527–44. Available from: <http://eprints.science-line.com/id/eprint/140/>
99. Chen JY, Yu YH. *Bacillus subtilis*–fermented products ameliorate the growth performance and alter cecal microbiota community in broilers under lipopolysaccharide challenge. *Poult Sci* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2023 Jan 11];100(2):875–86. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579120308464>
100. Hung AT, Lin SY, Yang TY, Chou CK, Liu HC, Lu JJ, et al. Effects of *Bacillus coagulans* ATCC 7050 on growth performance, intestinal morphology, and microflora composition in broiler chickens. *Anim Prod Sci*. 2012;52(9):874–9.
101. Hong Y, Cheng Y, Li Y, Li X, Zhou Z, Shi D, et al. Preliminary Study on the Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* TL on Cecal Bacterial Community Structure of Broiler Chickens. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1155/2019/5431354>
102. Zhang B, Zhang H, Yu Y, Zhang R, Wu Y, Yue M, et al. Effects of *Bacillus coagulans* on growth performance, antioxidant capacity, immunity function, and gut health in broilers. *Poult Sci* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2023 Jan 11];100(6). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579121002029>
103. Bilal M, Si W, Barbe F, Chevaux E, Sienkiewicz O, Zhao X. Effects of novel probiotic strains of *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* on production, gut health, and immunity of broiler chickens raised under suboptimal conditions. *Poult Sci* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2023 Jan 11];100(3). Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579120309007>

104. Zhen W, Shao Y, Gong X, Wu Y, Geng Y, Wang Z, et al. Effect of dietary *Bacillus coagulans* supplementation on growth performance and immune responses of broiler chickens challenged by *Salmonella enteritidis*. *Poult Sci* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2023 Jan 11];97(8):2654–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey119>
105. Wu Y, Shao Y, Song B, Zhen W, Wang Z, Guo Y, et al. Effects of *Bacillus coagulans* supplementation on the growth performance and gut health of broiler chickens with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *J Anim Sci Biotechnol* [Internet]. 2018 Jan 25 [cited 2023 Jan 11];9(1). Available from: <https://jasbsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40104-017-0220-2>
106. Baruzzi F, Quintieri L, Morea M, Caputo L. Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food. 2011;
107. Keerqin C, Rhayat L, Zhang ZH, Gharib-Naseri K, Kheravii SK, Devillard E, et al. Probiotic *Bacillus subtilis* 29,784 improved weight gain and enhanced gut health status of broilers under necrotic enteritis condition. *Poult Sci*. 2021 Apr 1;100(4).
108. Lee KWKKW, Kim DDK, Lillehoj HSH, Jang SI, Lee SH, ... SJ-A feed science and, et al. Immune modulation by *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials in commercial broiler chickens. *Anim Feed Sci Technol* [Internet]. 2015 [cited 2023 Jan 11];200(1):76–85. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840114004076>
109. Li Y, Zhang H, Chen YP, Yang MX, Zhang LL, Lu ZX, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* supplementation alleviates immunological stress in lipopolysaccharide-challenged broilers at early age. *Poult Sci*. 2015 Apr 23;94(7):1504–11.
110. Molnár AK, Podmaniczky B, Kürti P, Glávits R, Virág G, Szabó Z, et al. Effect of Different Concentrations of *Bacillus subtilis* on Immune Response of Broiler Chickens. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2011 Mar;3(1):8–14.
111. Wang Y, Heng C, Zhou X, Cao G, Jiang L, Wang J, et al. Supplemental *Bacillus subtilis* DSM 29784 and enzymes, alone or in combination, as alternatives for antibiotics to improve growth performance, digestive enzyme activity, anti-oxidative status, immune response and the intestinal barrier of broiler chickens. *Br J Nutr* [Internet]. 2021 Mar 14 [cited 2023 Jan 11];125(5):494–507. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/supplemental-bacillus-subtilis-dsm29784-and-enzymes-alone-or-in-combination-as-alternatives-for-antibiotics-to-improve-growth-performance-digestive-enzyme-activity-antioxidative->
112. Wealleans AL, Walsh MC, Romero LF, Ravindran V. Comparative effects of two multi-enzyme combinations and a *Bacillus* probiotic on growth performance, digestibility of energy and nutrients, disappearance of non-starch polysaccharides, and gut microflora in broiler chickens. *Poult Sci*. 2017 Dec

1;96(12):4287–97.

113. Rivera-Pérez W, Barquero-Calvo E, Chaves AJ. Effect of the use of probiotic *Bacillus subtilis* (QST 713) as a growth promoter in broilers: an alternative to bacitracin methylene disalicylate. *Poult Sci* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2023 Jan 11];100(9). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579121003953>
114. Manafi M, Hedayati M, Mirzaie S. Probiotic *Bacillus* species and *Saccharomyces boulardii* improve performance, gut histology and immunity in broiler chickens. *South African J Anim Sci*. 2018;48(2):379–89.
115. Sikandar A, Zaneb H, Younus M, Masood S, Aslam A, Shah M, et al. Growth performance, immune status and organ morphometry in broilers fed *Bacillus subtilis*-supplemented diet. *journals.co.za* [Internet]. 2017 [cited 2023 Jan 11];47(3):378–88. Available from: <https://journals.co.za/doi/abs/10.4314/sajas.v47i3.14>
116. Ruiz Sella SRB, Bueno T, de Oliveira AAB, Karp SG, Soccol CR. *Bacillus subtilis natto* as a potential probiotic in animal nutrition. <https://doi.org/101080/0738855120201858019> [Internet]. 2021 [cited 2023 Mar 18];41(3):355–69. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07388551.2020.1858019>
117. Khalid F, Khalid A, Fu Y, Hu Q, Zheng Y, Khan S, et al. Potential of *Bacillus velezensis* as a probiotic in animal feed: a review. *J Microbiol* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2023 Mar 18];59(7):627–33. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12275-021-1161-1>
118. Larsen N, Thorsen L, Kpikpi EN, Stuer-Lauridsen B, Cantor MD, Nielsen B, et al. Characterization of *Bacillus* spp. strains for use as probiotic additives in pig feed. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2023 Mar 18];98(3):1105–18. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-013-5343-6>
119. Castañeda CD, Gamble JN, Wamsley KGS, McDaniel CD, Kiess AS. In ovo administration of *Bacillus subtilis* serotypes effect hatchability, 21-day performance, and intestinal microflora. *Poult Sci*. 2021 Jun 1;100(6):101125.
120. Triplett MD, Zhai W, Peebles ED, McDaniel CD, Kiess AS. Investigating commercial in ovo technology as a strategy for introducing probiotic bacteria to broiler embryos. *Poult Sci*. 2018 Feb 1;97(2):658–66.
121. Zhu K, Hölzel CS, Cui Y, Mayer R, Wang Y, Dietrich R, et al. Probiotic *Bacillus cereus* Strains, a Potential Risk for Public Health in China. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [cited 2023 Mar 15];7(MAY). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27242738/>
122. Kim WH, Lillehoj HS. Immunity, immunomodulation, and antibiotic alternatives to maximize the genetic potential of poultry for growth and disease response. *Anim Feed Sci Technol* [Internet]. 2019 [cited 2023 Jan 11];250:41–50.

Available
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840118301858>

from: