



REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

www.elsevier.es/ram



ARTÍCULO ESPECIAL

Probióticos en pollos parrilleros: una estrategia para los modelos productivos intensivos[☆]



Jesica E. Blajman^a, María V. Zbrun^{a,b}, Diego M. Astesana^a, Ayelén P. Berisvil^a,
Analía Romero Scharpen^a, Marcia L. Fusari^b, Lorena P. Soto^{a,b},
Marcelo L. Signorini^{b,c}, Marcelo R. Rosmini^b y Laureano S. Frizzo^{a,b,*}

^a Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (ICIVET-CONICET/UNL), Esperanza, Santa Fe, Argentina

^b Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santa Fe, Argentina

^c Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Rafaela, Santa Fe, Argentina

Recibido el 30 de marzo de 2015; aceptado el 5 de agosto de 2015

Disponible en Internet el 22 de noviembre de 2015

PALABRAS CLAVE

Pollos parrilleros;
Microbiota intestinal;
Probióticos

Resumen La industria avícola se ha convertido en una importante actividad económica en Argentina. En nuestro país, el consumo de carne aviar ha experimentado un aumento sustancial en los últimos años debido al incremento y a la diversificación de la oferta de productos. Gracias a los avances tecnológicos experimentados en los últimos años (mejoras genéticas, automatizaciones, planes sanitarios, etc.), el pollo parrillero alcanza en solo 50 días el peso requerido para la faena, con 2,7 kg y una conversión alimentaria de alrededor de 1,6 kg de alimento/kg de carne. Para satisfacer la demanda actual y continuar en la búsqueda de mercados internacionales, los pollos parrilleros son sometidos a sistemas de crianza intensivos en confinamiento. En esos sistemas, los pollos parrilleros están expuestos diariamente a diversos factores de estrés. La suplementación con antibióticos fue ampliamente utilizada en las últimas décadas para estabilizar la microbiota intestinal, mejorar los parámetros productivos y prevenir las enfermedades aviares. Sin embargo, la utilidad de esta estrategia ha sido cuestionada debido a la aparición y propagación de bacterias resistentes a los antibióticos en la carne. Por lo tanto, hay un renovado interés en la búsqueda de alternativas viables a los antibióticos; es así que la suplementación de las dietas con probióticos se plantea como una opción interesante. Esta revisión proporciona un resumen actual sobre el empleo de probióticos en pollos parrilleros, haciendo énfasis en el papel de estos como una terapia alternativa que podría reemplazar a los antibióticos utilizados en producción y sanidad animal.

© 2015 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

[☆] Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto CAI + D 501 201101 00006 LI «Utilización de la microbiota indígena, provenientes de animales domésticos, para mejorar las condiciones sanitarias y la performance en modelos productivos intensivos».

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lfrizzo@fcv.unl.edu.ar (L.S. Frizzo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.08.002>

0325-7541/© 2015 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Broilers;
Intestinal microbiota;
Probiotics

Probiotics in broilers' rearing: A strategy for intensive production models

Abstract The broiler industry has become an important economic activity in Argentina. Global production of broiler meat has been growing in Argentina faster than for any other meats, possibly due to declining poultry prices and increasing incomes. Modern rearing systems can produce broilers ready to slaughter in 50 days, with the required 2.7 kg of weight and a feed conversion of about 1.6 kg feed/kg of meat. Nevertheless, broilers raised under these intensive conditions are exposed to various stressors every day. For many years, feed supplementation with antibiotics was widely used to stabilize the gut flora, improve general parameters and prevent avian diseases. However, the utility of antibiotics has been questioned because of the emergence and spread of antibiotic-resistant bacteria in meat. Therefore, there is a renewed interest in finding viable alternatives to antibiotics. One potential method is the supplementation of broiler diets with probiotics. This review provides an updated summary of the use of probiotics to improve sanitary conditions and enhance performance in broilers, demonstrating the role of probiotics as a reliable option to replace antimicrobial growth promoters.

© 2015 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

De acuerdo con las cifras aportadas por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, en los últimos años en Argentina se ha incrementado notablemente el consumo de carne de ave, la ingesta anual promedio se ha estimado en 39,66 kg por habitante⁴⁹. La producción total de carne aviar fue de 1.753.000 toneladas en el año 2014. Argentina tiene un protagonismo importante en el mercado internacional de carne de ave, en el que ocupa el octavo lugar como productor y el sexto como exportador.

A lo largo de los años, las condiciones de producción aviar han evolucionado y esto ha modificado la capacidad de resistencia natural de los pollos parrilleros. La crianza intensiva limita el contacto materno y utiliza nuevos métodos de alimentación y condiciones de hábitat artificiales. Asimismo, la utilización de animales más productivos y el incremento del uso de antibióticos favorecen las condiciones de estrés de las aves, incrementan las deficiencias en la composición de su microbiota intestinal, hacen más frecuentes los desórdenes digestivos y producen una menor resistencia natural a la colonización por microorganismos patógenos^{23,40,51}.

Desde su descubrimiento, los antibióticos han representado una herramienta importante para el tratamiento de las enfermedades infecciosas en el hombre y los animales. Se han suministrado a los animales de granja junto con la dieta con un doble propósito: por un lado, permitir la prevención o el tratamiento de los cuadros bacterianos y, por el otro, favorecer el crecimiento de los animales^{2,67}. Sin embargo, desde hace algunos años, el uso de antibióticos se ha restringido en ciertos países. Desde 2006, la Unión Europea instauró la total prohibición del uso de antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal. El uso de estos productos en forma indiscriminada produjo la aparición de cepas bacterianas resistentes, proceso que se potenció por la capacidad de las bacterias de transferir la resistencia, incluso entre diferentes géneros y especies^{3,73}. Las terapias con antibióticos, si bien

controlan los microorganismos patógenos, también afectan a muchos microorganismos benéficos, lo que origina trastornos en el equilibrio de la microbiota gastrointestinal⁴⁴. Muchos de estos antibióticos o sus residuos pueden quedar en los tejidos animales destinados al consumo humano. El conocimiento de que el uso de los probióticos puede sustituir las terapias con antibióticos brinda una nueva alternativa menos agresiva.

El avance en el conocimiento de que el uso de probióticos puede sustituir las terapias con antibióticos brinda una nueva alternativa menos agresiva^{21,61,66}.

El papel de la microbiota intestinal

El intestino delgado del pollo recién nacido es inmaduro y su desarrollo requiere cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares. Estos cambios acontecen durante las 2 primeras semanas de vida, y los más trascendentes son los que suceden dentro de las 24 h después del nacimiento⁴⁶. A medida que el animal crece, se establece una comunidad microbiana cada vez más compleja⁷⁵, y cada región desarrolla un perfil microbiano específico²⁸. Cuando los animales se desarrollan en sistemas de producción extensivos o en forma silvestre, el aparato digestivo es colonizado espontáneamente por la microbiota del entorno y se genera una simbiosis benéfica con el hospedador³⁶. El tracto gastrointestinal (TGI) de los pollos contiene bacterias, hongos y protozoos, aunque las bacterias son los microorganismos predominantes²⁴, con una concentración en el íleon de $10^{8,9}$ UFC/g y en los ciegos de $10^{10,11}$ UFC/g⁴⁸. Se estima que el TGI de los pollos posee cerca de 10^{13} bacterias y que solo entre el 10% y el 60% de aquellas han podido ser cultivadas e identificadas por métodos de cultivo convencionales³⁹. Las especies predominantes en íleon corresponden al género *Lactobacillus*, en primer lugar, y luego a las familias *Clostridiaceae*, *Streptococcaceae* y *Enterococcaceae*. En contraste, el grupo más abundante detectado en los ciegos es *Clostridiaceae*⁴⁷.

En las crianzas intensivas, la posibilidad de adquirir la microbiota autóctona natural está fuertemente disminuida, lo que conduce a que el intestino sea fácilmente colonizado por patógenos, entre los que sobresalen *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., que pueden desencadenar respuestas inflamatorias, producir infecciones localizadas o sistémicas, o sintetizar toxinas o compuestos perjudiciales⁴⁶. Si consideramos las importantes pérdidas económicas que originan estos agentes patógenos en las explotaciones aviares, es evidente el interés que puede suscitar la manipulación de la microbiota intestinal como una estrategia para prevenir la colonización de enteropatógenos, así como para promover la salud y el rendimiento productivo de los pollos parrilleros⁹.

Pasado y presente de los probióticos

El término probiótico significa «a favor de la vida» y actualmente se utiliza para designar bacterias y levaduras que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. Los primeros conocimientos con base científica surgieron de los estudios que realizó Metchnikoff, a principios del siglo xx. Este investigador sugirió que la larga vida de los campesinos en Bulgaria era el resultado del consumo de los productos de leche fermentada que contenían cepas de bacterias ácido-lácticas (BAL), algunas de las cuales presentan propiedades probióticas. Sin embargo, dada la masificación del uso de antibióticos, no fue sino hasta la década de los sesenta cuando se intensificó la búsqueda de conocimientos que fundamentaran el efecto benéfico de determinados microorganismos para la salud del hombre y de los animales.

La definición más reciente de probióticos fue propuesta por la *International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics*. Estos fueron definidos como «microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio saludable al hospedador»³⁰. A su vez, un grupo de expertos convocados por esta entidad publicó un nuevo documento 12 años después con el fin de actualizar los conocimientos adquiridos respecto de los probióticos; se llegó así al documento de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud¹⁷.

En la actualidad, el uso de probióticos en animales de producción está destinado a mejorar la conversión alimenticia, a promover el crecimiento y a inhibir el desarrollo de bacterias patógenas⁶¹. Frizzo *et al.*²⁰ administraron a terneros lactantes un inóculo probiótico formado por una suspensión de 3 microorganismos. El inóculo utilizado produjo una evolución positiva de los pesos de los terneros criados en condiciones artificiales. En tanto, Ross *et al.*⁶² demostraron que la administración de probióticos a cerdos en fase de cría mejoraba el perfil lipídico de la carne. Por otra parte, Tellez *et al.*⁷¹ evaluaron el efecto protector en pollos parrilleros de un suplemento probiótico frente a un desafío con *Salmonella* sp. La administración preventiva de este suplemento probiótico permitió la disminución de la colonización de hígado, bazo y ciego en los pollos tratados.

Es interesante destacar que, aun cuando solo existe una vasta experiencia en el empleo de probióticos en aves y mamíferos, su utilización se ha propagado a especies de

otros grupos. El empleo de BAL en abejas se hace posible puesto que se ha señalado su presencia como responsable de los cambios metabólicos y procesos fermentativos que permiten la preservación del pan de abeja. Este pan de abeja es el alimento que las abejas nodrizas dan a las larvas en el cuadro de cría. Si se añaden BAL que hayan sido seleccionadas según algún criterio determinado, por ejemplo, inhibición de algún microorganismo patógeno, se estaría colaborando con la presencia de estos agentes en el alimento que recibirá la cría⁴. En los últimos años, se han multiplicado los estudios referidos al uso de cultivos probióticos en acuicultura, utilizando microorganismos aislados del ambiente acuático. Se ha indicado no solo su efecto como agentes de control biológico de enfermedades, sino también como promotores de crecimiento, logrando así organismos más sanos y con tallas adecuadas para su comercialización en menor tiempo^{41,76}.

Requisitos de los probióticos

Si bien está instaurado el concepto de reemplazar las bacterias patógenas del intestino con bacterias benéficas, aún persisten dudas sobre la eficacia de los probióticos disponibles, muchas de ellas derivadas de experiencias sin éxito con este tipo de productos, ya que algunos no dieron los resultados esperados^{6,78}. La variabilidad en los resultados puede deberse a que los probióticos proceden de otras regiones geográficas o incluso de otras especies animales, a las cepas usadas, a las dosis, a la composición de la dieta, a las estrategias de alimentación y a la interacción con otros aditivos alimenticios en la ración diaria^{11,55}. A su vez, el comportamiento animal en respuesta a la adición de probióticos está influenciado por múltiples factores, entre los cuales se encuentran la edad, la raza, el tipo de explotación, el uso de antibióticos, el estrés y el ambiente de la crianza, por lo que considerar estos factores es un punto crítico antes de utilizar estos productos¹⁹.

Para que un organismo sea considerado probiótico debe cumplir una serie de requisitos, como contar con su caracterización *in vitro*, lo que implica conocer la estabilidad fenotípica y genotípica y los patrones de utilización de hidratos de carbono y proteínas. Además, se tienen en cuenta la resistencia a la acidez gástrica, la resistencia a la bilis, la adhesión al epitelio intestinal y la resistencia a lisozima (opcional). Otros factores que se deben considerar son la capacidad de utilizar prebióticos (opcional) y la existencia de ensayos *in vivo* e *in vitro* que demuestren los efectos probióticos adjudicados. Asimismo, deben tener carácter *generally regarded as safe* (GRAS, reconocido como seguro para la salud) y no presentar resistencia a antibióticos ni determinantes de patogenicidad⁷⁴.

Mecanismos de acción de los probióticos en el tracto gastrointestinal de pollos parrilleros

Competencia por la adhesión en los receptores del epitelio intestinal y por nutrientes

Se refiere a la capacidad de las bacterias probióticas de competir con microorganismos patógenos por nutrientes y por un lugar en la pared intestinal para fijarse exitosamente en

el epitelio. Los microorganismos probióticos actúan como una barrera defensiva al impedir que el espacio del epitelio celular quede disponible para los patógenos, o al crear un ambiente desfavorable para aquellos⁵⁷. Ciertos microorganismos probióticos pueden expresar sitios de unión a hidratos de carbono complejos, similares a las adhesinas de la superficie celular que se encuentran en los agentes patógenos potenciales. Neeser *et al.*⁵³ encontraron que *Lactobacillus johnsonii* La1 tenía 2 sitios de unión a hidratos de carbono principales, por lo que podía inhibir la unión de los patógenos a los receptores de manano epiteliales de la mucosa.

Producción de sustancias antimicrobianas

Los efectos inhibitorios de las bacterias probióticas sobre los microorganismos indeseables pueden deberse a la producción de diferentes metabolitos como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), diacetilo, bacteriocinas y ácidos orgánicos. El efecto bactericida del H₂O₂ se atribuye a su potente acción oxidante, capaz de destruir componentes celulares esenciales⁵⁹. El diacetilo inhibe el desarrollo de microorganismos gramnegativos al interaccionar con el metabolismo de la arginina, impidiendo la utilización de este aminoácido³⁷.

Las bacteriocinas fueron inicialmente definidas como proteínas de bajo peso molecular biológicamente activas contra miembros de la misma especie o de especies muy relacionadas a la cepa productora^{34,70}. Sin embargo, este concepto se ha visto modificado, ya que se ha encontrado evidencia experimental de acciones bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora⁶³. Algunas investigaciones señalan que las bacteriocinas ejercen su actividad antimicrobiana provocando daños en la pared celular³². Stern *et al.*⁶⁹ utilizaron la cepa *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 aislada de ciego de pollos parrilleros para la producción de bacteriocinas. El tratamiento con dichas bacteriocinas mostró una reducción significativa en la prevalencia de *Campylobacter jejuni* en el intestino de los pollos. Line *et al.*⁴⁵ reportaron que el empleo de la bacteriocina E 760 producida por *Enterococcus durans/faecium/hirae* (NRRL B-30745) condujo a niveles no detectables de *Campylobacter* spp. cuando se administró en la dieta en una sola dosis 4 días antes del análisis.

Los probióticos pueden, además, producir sustancias antimicrobianas como ácido láctico, acético y propiónico, que acidifican el medio intestinal y así crean un ambiente hostil para el desarrollo de microorganismos nocivos, los que reducen significativamente su velocidad de multiplicación y comienzan a morir, al no encontrar un ambiente adecuado²². Para comprender este principio, debemos recordar que las bacterias enteropatógenas se multiplican y viven en pH 5,5 a 7,5. Yu *et al.*⁸⁰ observaron que los pollos inoculados con *Lactobacillus reuteri* Pg4 tenían una mayor concentración de ácido láctico y un pH más bajo en el ciego que los análogos no inoculados. Murry *et al.*⁵² determinaron que los ácidos grasos producidos por *L. salivarius* y *Lactobacillus plantarum* como parte de su metabolismo nutricional disminuían el pH del medioambiente intestinal y afectaban de esa manera a la supervivencia de bacterias patógenas, como *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Clostridium perfringens*.

Estimulación de la inmunidad

La manipulación de la microbiota intestinal a través de la administración de probióticos puede estimular el sistema inmunitario de diversas maneras: generando una mayor actividad de macrófagos y una mayor capacidad para fagocitar partículas de microorganismos, incrementando la producción de inmunoglobulinas G y M e interferón γ , y aumentando los anticuerpos locales en las superficies mucosas (IgA)¹.

No todos los microorganismos probióticos inducen el mismo tipo de efectos sobre la respuesta inmunitaria o sobre los microorganismos presentes en la luz intestinal, ni lo hacen con la misma intensidad. Higgins *et al.*²⁹ indicaron que la administración de un cultivo a base de *Lactobacillus* spp. luego del desafío de pollos parrilleros con *Salmonella enteritidis* redujo significativamente (respecto de los controles) la recuperación de *Salmonella* a partir de las tonsilas cecales 24 h después del tratamiento, probablemente por una estimulación de la respuesta inmunitaria innata.

Se ha demostrado que pollos tratados con probióticos producen mayor cantidad de anticuerpos frente a un determinado antígeno, cumpliendo un importante papel como adyuvantes^{33,50,68}. A modo de ejemplo, los títulos de anticuerpos luego de la vacunación contra el virus de la enfermedad de Newcastle y contra *Eimeria* fueron mayores en pollos que consumieron probióticos que en aquellos que no recibieron el tratamiento⁴². Otro estudio examinó los efectos de un probiótico a base de *Lactobacillus* spp. sobre la respuesta inmunitaria intestinal de pollos parrilleros en el transcurso de una infección por *Eimeria acervulina*¹³. Los pollos alimentados con probióticos mostraron una reducción en el número de ooquistes producidos después de la infección con una dosis infectiva de *E. acervulina*. El estudio sugiere un impacto positivo de los probióticos en la estimulación de algunas de las respuestas inmunitarias tempranas contra *E. acervulina*, como la secreción de interferón e interleucina 2, lo que resulta en una mejora de las defensas inmunitarias locales contra la coccidiosis.

Uso de probióticos como promotores de crecimiento

Algunos autores han reportado que los probióticos mejoran los parámetros productivos de las aves^{31,64,67,77}. Sin embargo, hay muchas otras investigaciones en las que los probióticos carecen de efectos positivos^{16,35,56,83}. Los datos de la literatura ofrecen una variedad de resultados dispares en lo referente a la eficacia de los probióticos como promotores de crecimiento.

Jin *et al.*³⁸ estudiaron el efecto de dos probióticos (*Lactobacillus acidophilus* I26 y una mezcla de 12 lactobacilos) sobre el crecimiento de pollos parrilleros. Comprobaron que la ganancia de peso era superior en los pollos tratados con probióticos respecto del grupo control. Asimismo, la eficiencia de conversión alimenticia de los grupos tratados con probióticos mejoró en relación con los controles. Sin embargo, cabe destacar que el uso de 12 cepas de lactobacilos para un tratamiento probiótico puede llegar a ser más costoso que las pérdidas asociadas a la mortalidad natural de los pollos del grupo no tratado. Blajman *et al.*⁸ analizaron en un metaanálisis los resultados de diferentes

investigaciones realizadas con probióticos en pollos parrilleros: los pollos que consumieron probióticos aumentaron en promedio 661 g más a lo largo de una crianza que aquellos que no consumieron probióticos. Asimismo, los pollos suplementados con probióticos utilizaron más eficientemente el alimento y necesitaron 281 g menos de alimento por cada kilogramo de peso vivo producido. En tanto, Telg y Caldwell⁷² no hallaron diferencias significativas en la conversión alimenticia ni en la ganancia de peso de pollos parrilleros por administración de un probiótico comercial.

Leone *et al.*⁴³ asociaron la mayor productividad de pollos suplementados con probióticos a una mayor altura de las vellosidades intestinales. El incremento de la función absorbente puede atribuirse al aumento de la superficie de absorción, de la expresión de enzimas del borde en cepillo y de los sistemas de transporte de nutrientes⁵. Los probióticos pueden sintetizar nutrientes, aportar enzimas que aumentan la actividad catalítica de las enzimas endógenas o reducir compuestos perjudiciales o antinutrientes. Jin *et al.*³⁸ demostraron que la administración de *L. acidophilus* o de un cultivo mixto de *Lactobacillus* spp. a pollos durante 40 días aumentaba significativamente los niveles de amilasa. También se ha descrito que el consumo de *Lactobacillus casei* por pollos causa una disminución de la actividad ureasa del intestino delgado, acompañada por una mejora de la productividad⁷⁹. Esta enzima está asociada con la conversión de ácido úrico (producto de excreción de nitrógeno en aves) en amoníaco, que es un compuesto tóxico para los enterocitos.

Métodos de administración de probióticos a pollos parrilleros

La vía de administración de los probióticos puede determinar la capacidad de colonización intestinal por las bacterias presentes en el producto empleado y, de esa manera, tiene una injerencia directa sobre el éxito del tratamiento. Las vías de administración más utilizadas en pollos parrilleros son la inclusión en el agua de bebida, la pulverización, la incorporación en los comederos o el agregado a las raciones, y, finalmente, la aplicación en dosis individuales. Ciertos estudios indican que la adición de los probióticos en el agua de bebida ocasiona una mejora en la productividad¹⁴. Sin embargo, algunos pollos recién nacidos se niegan a beber el agua, por lo que el probiótico podría propagarse de manera desigual entre los individuos²⁷. Asimismo, la viabilidad de los organismos anaerobios muestra un rápido descenso, especialmente en agua clorinada, lo que afecta a la concentración bacteriana óptima necesaria para ejercer los efectos benéficos en el hospedador⁶⁵. Eckert *et al.*¹⁴ demostraron que la administración de un probiótico sobre la base de *Lactobacillus* spp. a través del agua de bebida y el alimento incrementaba la ganancia de peso en pollos tratados con respecto a los controles. Sin embargo, la administración en alimento peletizado no fue tan eficaz como el suministro en el agua. Esto parece obedecer a que las BAL se destruyen en parte o totalmente por las altas temperaturas empleadas durante el proceso de peletización²⁷.

Para mejorar la viabilidad microbiana en el alimento se pueden aplicar diferentes técnicas de conservación, entre ellas la encapsulación, que retiene microorganismos dentro

de una matriz porosa. Rodklontan *et al.*⁶⁰ encapsularon la cepa *L. reuteri* KUB-AC5 destinada a pollos parrilleros en una matriz de alginato y quitosano; de ese modo, lograron mantener la viabilidad del probiótico durante el paso por el TGI.

La aplicación por aspersión permite tratar a los pollos con rapidez después de la eclosión y asegura una distribución homogénea del probiótico⁴⁶, ya que la dosis y el grosor de la gota que ingresa al tracto digestivo se controlan mecánicamente antes de la administración. Además, se ha demostrado que no causa efectos adversos sobre la salud o el rendimiento de las aves¹². Puede efectuarse de manera automática en los gabinetes de aspersión que se usan de forma rutinaria para la vacunación en las plantas incubadoras¹⁰ o en forma manual a través de aspersores tipo mochilas. El equipo utilizado para administrar el probiótico, la dosificación y la habilidad del personal que lo administra son factores clave que deben tomarse en consideración cuando se aplican probióticos por aspersión. Pivnick y Nurmi⁵⁸ fueron los primeros en usar aerosoles como método para administrar probióticos. Ghadban^{25,26} informó que la aplicación por aspersión de las preparaciones de exclusión competitiva era un método efectivo para el control de *Salmonella* spp. y *E. coli*, y mejoraba los parámetros productivos de los pollos tratados.

La aplicación en dosis individuales por intubación solo se ha utilizado en ensayos de laboratorio, cuando ha sido importante el control preciso de la dosis de tratamiento⁵⁴.

Monitorización de los probióticos

El conocimiento relacionado con el destino de las bacterias probióticas dentro del ambiente complejo de la microbiota intestinal es muy escaso y el estudio de la distribución de estas bacterias *in vivo* representa un gran desafío. La localización y el desplazamiento de los probióticos durante su tránsito por el TGI, así como su interacción con el sistema inmunitario del hospedador o con la microbiota endógena, se han comenzado a estudiar, pero aún no están bien entendidos⁸¹. En ese sentido, la utilización de herramientas de monitorización de las cepas probióticas *in vivo* pretende cooperar con la selección de cepas seguras y el entendimiento del mecanismo de acción de estas bacterias.

Ehrmann *et al.*¹⁵ generaron cepas resistentes a la rifampicina para poder rastrear el inóculo durante el ensayo *in vivo* en pollos parrilleros. Las cepas resistentes al antibiótico se obtuvieron por cultivos seriales en medio MRS, desde niveles bajos hasta una concentración de 100 µg/ml de rifampicina. La generación de mutantes resistentes a rifampicina facilitó la enumeración y el aislamiento de los integrantes del inóculo, y permitió diferenciarlo fácilmente de la microbiota indígena intestinal. Además, permitió verificar la ausencia del inóculo en los sitios extraintestinales.

Feng *et al.*¹⁸ analizaron los cambios en la microbiota intestinal de pollos infectados con *C. perfringens* mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE). La DGGE es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño, pero con diferente secuencia de nucleótidos. De manera similar, la DGGE podría ser un método exitoso para monitorizar *in vivo* las cepas que conforman un inóculo

probiótico y tipificar el consorcio microbiano presente en el TGI luego de su administración. Zhu *et al.*⁸² estudiaron la composición de la microbiota del ciego de pollos parrilleros mediante hibridación *in situ* fluorescente, técnica basada en la utilización de sondas de ADN complementarias de regiones específicas de las ARNr 16S y marcadas con fluorocromos.

Yu *et al.*⁸¹ desarrollaron un sistema que permitió el seguimiento y la identificación de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* D17 y *Lactobacillus fructosus* C2 a lo largo del TGI de pollos parrilleros. Las cepas en estudio se transformaron con un vector responsable de la expresión de la proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein* [GFP]). Los resultados obtenidos demostraron que las características de las cepas no eran afectadas por la introducción del vector exógeno y que el sistema de marcado fluorescente constituía una herramienta útil para la monitorización de los lactobacilos. Blajman *et al.*⁷ realizaron la monitorización de una bacteria marcada fluorescente a lo largo del tracto digestivo de pollos parrilleros. *L. salivarius* DSPV 003P fue marcada con isotiocianato de fluoresceína y administrada por vía oral. A intervalos frecuentes, se extrajeron muestras de buche, duodeno, ciego y bolsa de Fabricio, se incluyeron en parafina y se observaron en microscopio de fluorescencia. Esta metodología permitió efectuar la monitorización de una cepa potencialmente probiótica durante el tránsito intestinal de pollos parrilleros por un breve período.

Ante la disponibilidad de diferentes técnicas aplicables a estos estudios, resulta importante tratar de establecer qué metodología nos permitiría acceder a la mejor información, a fin de facilitar el desarrollo de nuevas investigaciones. Esta estrategia permitiría relacionar la localización y la carga microbiana en diferentes regiones del tracto intestinal con la generación de mejoras en la *performance* de crecimiento y en el estado sanitario de los pollos parrilleros durante la crianza intensiva.

Conclusiones

Se han realizado muchos estudios para validar el concepto de probióticos como uno de los aditivos alimenticios más prometedores del futuro. Las tendencias actuales en los sistemas intensivos de producción postulan a los probióticos como una buena alternativa para el reemplazo de los antibióticos promotores de crecimiento. El consumo de probióticos en producción aviar ha aumentado considerablemente en los últimos años debido a los beneficios que genera en el hospedador. Esta práctica está encaminada a mejorar el balance microbiano en el TGI, inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, estimular la respuesta inmunitaria y mejorar la *performance* de crecimiento. El empleo de probióticos en la producción de pollos parrilleros es una estrategia para mejorar las condiciones sanitarias y de producción de las explotaciones intensivas, como así para obtener materias primas a gran escala, asegurando su inocuidad y la de los alimentos de origen animal que a partir de ellas se generen.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Ahmad I. Effect of probiotics on broilers performance. *Int J Poult Sci.* 2006;5:593–7.
- Alkhalf A, Alhaj M, Al-Homidan M. Influence of probiotic supplementation on blood parameters and growth performance in broiler chickens. *Saudi J Biol Sci.* 2010;17:219–25.
- Apata DF. Antibiotic resistance in poultry. *Int J Poult Sci.* 2009;8:404–8.
- Audisio MC, Ahrendts Benítez M, Apella MC, Eguaras MJ. Probióticos en apicultura. En: Cormenzana A, Nader-Macías MEF, Monteoliva Sanchez M, editores. *Probióticos y Salud.* Madrid: Díaz de Santos; 2012. p. 449–62.
- Awad WA, Ghareeb K, Abdel-Raheem S, Böhm J. Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poult Sci.* 2009;88:49–55.
- Bitterncourt LC, Silva CC, Garcia PDSR, Zanardo DCZ, Albuquerque R, Araújo LF. Influence of a probiotic on broiler performance. *R Bras Zootec.* 2011;40:2739–43.
- Blajman JE, Astesana DM, Zimmermann JA, Berisvil AP, Olivero CR, Sequeira, GJ, Zbrun MV, Frizzo LS. Use of fluorescein isothiocyanate to monitor *Lactobacillus salivarius* DSPV 003P during intestinal transit in broilers. IV Simposio Internacional de Bacterias Lácticas (SIBAL), 2013, Resumen B25, San Miguel de Tucumán, Argentina.
- Blajman JE, Frizzo LS, Zbrun MV, Astesana DM, Fusari ML, Soto LP, Rosmini MR, Signorini ML. Probiotics and broiler growth performance: A meta-analysis of randomised controlled trials. *Br Poult Sci.* 2014;55:483–94.
- Chambers JR, Gong J. The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. *Food Res Int.* 2011;44:3149–59.
- Chen M, Stern NJ, Bailey JS, Cox NA. Administering mucosal competitive exclusion flora for control of salmonellae. *J Appl Poult Res.* 1998;7:384–91.
- Chesson A. Phasing out antibiotic additives in the EU: World-wide relevant for animal food production. En: Barug D, Jong J, Kies AK, Verstegen MWA, editores. *Antimicrobial Growth Promoters: Worldwide Ban on the Horizon? Bastiaanse Communication: Noordwijk aan Zee;* 2005. p. 20–2.
- Corrier DE, Hinton A, Ziprin RL, Beier RC, DeLoach JR. Effect of dietary lactose on cecal pH, bacteriostatic volatile fatty acids, and *Salmonella tiphymurium* colonization of broiler chicks. *Avian Dis.* 1990;34:617–25.
- Dalloul RA, Lillehoj HS, Tamim NM, Shellem TA, Doerr JA. Induction of local protective immunity to *Eimeria acervulina* by a *Lactobacillus*-based probiotic. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2005;28:351–61.
- Eckert NH, Lee JT, Hyatt D, Stevens SM, Anderson S, Anderson PN, Beltran R, Schatzmayr G, Mohl M, Caldwell DJ. Influence of probiotic administration by feed or water on growth parameters of broilers reared on medicated and nonmedicated diets. *J Appl Poult Res.* 2010;19:59–67.

15. Ehrmann MA, Kurzak P, Bauer J, Vogel RF. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J Appl Microbiol.* 2002;92:966–75.
16. Ergun A, Yalcin S, Sacakli P. The usage of probiotic and zinc bacitracin in broiler rations. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi.* 2000;47:271–80.
17. FAO/WHO. Joint FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint working group report on drafting. London, Ontario, 2002; 1-11.
18. Feng Y, Gong J, Yu H, Jin Y, Han Y. Identification of changes in the composition of ileal bacterial microbiota of broiler chickens infected with *Clostridium perfringens*. *Vet Microbiol.* 2010;140:116–21.
19. Fox S. Probióticos en la nutrición animal. *Mundo Porcino.* 1994;17:28–32.
20. Frizzo LS, Soto LP, Zbrun MV, Signorini ML, Bertozzi E, Sequeira GJ, Rodriguez Armesto R, Rosmini MR. Effect of lactic acid bacteria and lactose on growth performance and intestinal microbial balance of artificially reared calves. *Livestock Sci.* 2011;140:246–52.
21. Frizzo LS, Zbrun MV, Soto LP, Signorini ML. Effects of probiotics on growth performance in young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Anim Feed Sci Tech.* 2011;169:147–56.
22. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 1989;66:365–78.
23. Fuller R. History and development of probiotics. En: Fuller R, editor. *Probiotics: The scientific basis.* Londres: Chapman & Hall; 1992. p. 1–8.
24. Gabriel I, Lessire M, Mallet S, Guillot JF. Microflora of the digestive tract: Critical factors and consequences for poultry. *World Poult Sci J.* 2006;62:499–511.
25. Ghadban G. Investigation on the efficacy of early probiotic treatment on the performance of broiler chicks. En: *Proceedings of 10th European Poultry Conference.* 1998. p. 305–10, 2.
26. Ghadban G. Studying on productivity of chickens broilers treated by biological products. Ph.D. thesis 1999. Thracian University.
27. Ghadban GS. Probiotics in broiler production —a review. *Arch Geflügelk.* 2002;66:49–58.
28. Gong J, Yu H, Liu T, Gill JJ, Chambers JR, Wheatcroft R, Savour PM. Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. *J Appl Microbiol.* 2008;104:1372–82.
29. Higgins SE, Erf GF, Higgins JP, Henderson SN, Wolfenden AD, Gaona-Ramirez G, Hargis BM. Effect of probiotic treatment in broiler chicks on intestinal macrophage numbers and phagocytosis of *Salmonella* Enteritidis by abdominal exudate cells. *Poult Sci.* 2007;86:2315–21.
30. Hill C, Guarnier F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;11:506–14.
31. Kabir SML, Rahman MM, Rahman MB, Rahman MM, Ahmed SU. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. *Int J Poult Sci.* 2004;3:361–4.
32. Kailasapathy K, Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol Cell Biol.* 2000;78:80–8.
33. Khan SH, Yousaf B, Mian AA, Rehman A, Farooq MS. Assessing the effect of administering different probiotics in drinking water supplement on broiler performance, blood biochemistry and immune response. *J Appl Anim Res.* 2011;39:418–28.
34. Klaenhammer TR. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemie.* 1988;70:337–49.
35. Kumprechtova D, Zobac P, Kumprecht I. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 on chicken broiler performance and nitrogen output. *Czech J Anim Sci.* 2000;45:169–77.
36. Kurzak P, Ehrmann MA, Vogel R. Diversity of lactic acid bacteria associated with ducks. *Syst Appl Microbiol.* 1998;21:588–92.
37. Jay JM. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl Environ Microbiol.* 1982;44:525–31.
38. Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with lactobacillus cultures. *Poult Sci.* 2000;79:886–91.
39. Johansen CH, Bjerrum L, Finster K, Pedersen K. Effects of a *Campylobacter jejuni* infection on the development of the intestinal microflora of broiler chickens. *Poult Sci.* 2006;85:579–87.
40. Lan Y, Verstegen MWA, Tamminga S, Williams BA. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. *Worlds Poult Sci J.* 2005;61:95–104.
41. Lara-Flores M, Olivera-Castillo L, Olvera Novoa MA. Effect of the inclusion of a bacterial mix (*Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*), and the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth, feed utilization and intestinal enzymatic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *IJFAS.* 2010;2:93–101.
42. Lee K-W, Li G, Lillehoj HS, Lee SH, Jang SI, Babu US, Lillehoj EP, Neumann AP, Siragusa GR. Bacillus subtilis-based direct-fed microbials augment macrophage function in broiler chickens. *Res Vet Sci.* 2011;91:87–91.
43. Leone E, Alves de Souza P, Alves de Souza H, Oba A, Norkus E, Kodawara L, Azevedo de Lima T. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. *RPCV.* 2003;98:125–34.
44. Lin J, Hunkapiller AA, Layton AC, Chang YJ, Robbins KR. Response of intestinal microbiota to antibiotic growth promoters in chickens. *Foodborne Phat Dis.* 2013;10:331–7.
45. Line JE, Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Levchuk VP, Svetoch OE, Seal BS, Siragusa GR, Stern NJ. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1094–100.
46. Londero A. Alimentos funcionales: obtención de un producto probiótico para aves a partir de suero de quesería fermentado con microorganismos de kéfir. Tesis doctoral 2012. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
47. Lu J, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JJ, Lee MD. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:6816–24.
48. Mead GC. Bacteria in the gastrointestinal tract of birds. En: Mackie RI, White BA, Isaacson RE, editors. *Gastrointestinal microbiology, 2.* New York: Chapman & Hall; 1997. p. 216–40.
49. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Presidencia de la Nación [consultado 1 Mar 2015]. Disponible en: <http://www.minagri.gob.ar/site/ganaderia/aves>.
50. Molnár AK, Podmaniczky B, Kürti P, Tenk I, Glávits R, Virág GY, Szabó ZS. Effect of different concentrations of *Bacillus subtilis* on growth performance, carcass quality, gut microflora and immune response of broiler chickens. *Br Poult Sci.* 2011;52:658–65.
51. Mulder RW, Havenaar R, Huis int Veld JH. Intervention strategies: the use of probiotics and competitive exclusion microbionas against contamination with pathogens in pigs and poultry. En: Fuller R, editor. *Probiotics: 2. Application and practical aspects.* Londres: Chapman & Hall; 1997. p. 187–207.

52. Murry AC, Hinton A, Morrison H. Inhibition of growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridium perfringens* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. *Int J Poult Sci*. 2004;3:603–7.
53. Neeser JR, Granato D, Rouvet M, Servin A, Teneberg S, Karlsson KA. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology*. 2000;10:1193–9.
54. Nurmi E, Rantala M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature*. 1973;241:210–1.
55. Rigobelo E, editor. 2012. Variations on the efficacy of probiotics in poultry. En: *Probiotic in animals*. InTech [On-line] [consultado el 7 Feb 2015]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/probiotic-in-animals/variaciones-on-the-eficacy-of-probiotics-in-poultry>.
56. Patidar SK, Prajapati JB. Effect of feeding *Lactobacilli* on serum antibody titer and faecal microflora in chicks. *Microbiologic Aliments Nutr*. 1999;17:145–54.
57. Patterson JA, Burkholder KM. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci*. 2003;82:627–31.
58. Pivnick H, Nurmi E. The Nurmi concept and its role in the control of *Salmonella* in poultry. En: Davies R, editor. *Developments in food microbiology 1*. London: Applied Science Publishers; 1982. p. 41–70.
59. Requena T, Revisión Peláez C. Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Rev Esp Cie Tec Ali*. 1995;35:19–44.
60. Rodklongtan A, La-ongkham O, Nitisinprasert S, Chitprasert P. Enhancement of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 survival in broiler gastrointestinal tract by microencapsulation with alginate–chitosan semi-interpenetrating polymer networks. *J Appl Microbiol*. 2014;117:227–38.
61. Rosmini MR, Sequeira G, Guerrero Legarreta I, Marti L, Dalla Santina R, Frizzo L, Bonazza JC. Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Rev Mex Ing Qca*. 2004;3:187–97.
62. Ross GR, van Nieuwenhove CP, González SN. Fatty acid profile of pig meat after probiotic administration. *J Agric Food Chem*. 2012;60:5974–8.
63. Sablon E, Contreras B, Vandamme E. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetic and biosynthesis. *Adv Bioch Eng Biotechnol*. 2000;68:21–60.
64. Sánchez J, Esteve-García E, McNab J, Díaz D, Gracia MI. Bioefficacy of a probiotic feed additive in broiler diets. En: 16th European Symposium on Poultry Nutrition. 2007. p. 619–22.
65. Seuna E, Raevuori M, Nurmi E. An epizootic of *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen in broilers and the use of cultured chicken intestinal flora for its control. *Br Poult Sci*. 1978;19:309–14.
66. Signorini ML, Soto LP, Zbrun MV, Sequeira GJ, Rosmini MR, Frizzo LS. Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. *Res Vet Sci*. 2011;93:250–8.
67. Sinol Sen SL, Ingale JS, Kim KH, Kim YW, Kim Chou Khong JD, Lohakare Kim EK, Kim HS, Kwon IK, Chae BJ. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 grown on citrus-juice waste and corn-soybean meal substrate on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology of broilers. *Asian-Aust J Anim Sci*. 2011;24:1120–7.
68. Shahir MH, Afsarian O, Ghasemi S, Tellez G. Effects of dietary inclusion of probiotic on growth performance, organ weight, blood parameters and antibody titers against Influenza and Newcastle in broiler chickens. *Int J Poult Sci*. 2014;13:70–5.
69. Stern NJ, Eruslanov BV, Pokhilenko V, Kovalev YN, Volodina LL, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Borzenkov VN, Levchuk VP, Svetoch OE, Stepanshin YG, Svetoch EA. Bacteriocins reduce *Campylobacter jejuni* colonization while bacteria producing bacteriocins are ineffective. *Microb Ecol Health Dis*. 2008;20:74–9.
70. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev*. 1976;40:722–56.
71. Tellez G, Petrone VM, Escorcía M, Morishita TY, Cobb CW, Villaseñor L. Evaluation of avian-specific probiotic and *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Heidelberg specific antibodies on cecal colonization and organ invasion of *Salmonella* Enteritidis in broilers. *J Food Prot*. 2001;5:287–91.
72. Telg BE, Caldwell DJ. Efficacy testing of a defined competitive exclusion product in combination with fructooligosaccharide for protection against *Salmonella* Typhimurium challenge in broiler chicks. *J Appl Poultry Res*. 2009;18:521–9.
73. Thibodeau A, Quessy S, Guévremont E, Houde A, Topp E, Diarra MS, Letellier A. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolates from commercial broiler chickens receiving growth-promoting doses of bacitracin or virginiamycin. *Can J Vet Res*. 2008;72:129–36.
74. Tuomola E, Crittenden R, Playne M, Isolauri E, Salminen S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr*. 2001;73:393–8.
75. Van der Wielen PWJJ, Keuzenkamp DA, Lipman LJA, van Knapen F, Biesterveld S. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. *Microb Ecol*. 2002;44:286–93.
76. Vázquez JA, González MP, Murado MA. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*. 2005;245:149–61.
77. Wang Y, Gu Q. Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of Arbor Acres broilers. *Res Vet Sci*. 2010;89:163–7.
78. Willis WL, Reid L. Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. *Poult Sci*. 2008;87:606–11.
79. Yeo J, Kim K. Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic, or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. *Poult Sci*. 1997;76:381–5.
80. Yu B, Liu JR, Chiou MY, Hsu YR, Chiou PWS. The effects of probiotic *Lactobacillus reuteri* Pg4 strain on intestinal characteristics and performance in broilers. *Asian-Aust J Anim Sci*. 2007;20:1243–51.
81. Yu QH, Dong SM, Zhu WY, Yang Q. Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus* in the gastro-intestinal tract of chicken. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;275:207–13.
82. Zhu X, Joerger R. Composition of microbiota in content and mucus from caecae of broiler chickens as measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Poult Sci*. 2003;82:1242–9.
83. Zuñon JA, J.B-Fonseca S, Rostagno HS, Almeida M, Silva M. Effects of growth promoters on broiler chicken performance. *Rev Bras Zootecn*. 1998;27:999–1005.