

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Instituto de Ciencias Agrícolas



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA
SUPLEMENTACIÓN CON *Bacillus subtilis* SOBRE EL
COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y LA
MICROBIOTA INTESTINAL DE CERDOS
DESTETADOS**

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

INGENIERO BIOTECNÓLOGO AGROPECUARIO

PRESENTA:

AHARÓN ANTHONY BRASSEA LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ADRIANA MORALES TREJO

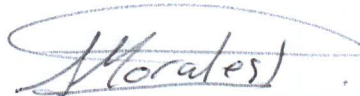
Mexicali, Baja California

Septiembre de 2018

La presente tesis titulada "EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON *Bacillus subtilis* SOBRE EL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y LA MICROBIOTA INTESTINAL DE CERDOS DESTETADOS ", realizada por C. Aharón Anthony Brassea López; bajo la dirección de la Dra. Adriana Morales Trejo, siendo aceptada, revisada y aprobada, por el Comité Particular abajo indicado como requisito parcial para obtener el grado de:

INGENIERO BIOTECNÓLOGO AGROPECUARIO

Comité particular



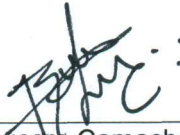
Dra. Adriana Morales Trejo

Director de Tesis



Dr. Miguel Cervantes Ramirez

Codirector de Tesis



Dra. Reyna Lucero Camacho Morales

Sinodal



Dr. Lorenzo Buenabad Carrasco

Sinodal



M.C. Carlos Alberto Martínez Vidal

Sinodal

"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE"

Ejido Nuevo León, Mexicali Baja California, México; Septiembre de 2018

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California por permitirme desarrollarme profesionalmente en esta reciente e innovadora carrera de Ingeniero Biotecnólogo Agropecuario.

Agradezco a mi directora de tesis, Dra. Adriana Morales Trejo, por todo el tiempo dedicado en el desarrollo de esta tesis, por confiar y creer en mí en esta etapa tan importante, por escuchar y confiar en mis ideas o sugerencias aunque a veces no tuviesen el éxito esperado, pero sobre todo por la gran paciencia que me tuvo a lo largo de este proceso. Me oriento de la manera adecuada, me hizo aprender mucho y me dejó un claro panorama de lo que se realiza en un trabajo de investigación. La admiro mucho.

Al Dr. Miguel Cervantes Ramírez, por compartir su pasión y emoción por la investigación, por su amplio conocimiento, por su apoyo en el proceso de mi tesis y pronta respuesta a mis dudas.

En general a todos los que conforman el Cuerpo Académico de Nutrición Animal. Me recibieron y adaptaron a su equipo de una manera que no me esperaba, estoy muy agradecido.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres por todo el apoyo brindado desde el inicio de mis estudios hasta ahora que me encuentro terminando mi etapa profesional. Siempre han tenido fe en mí y han confiado en mis decisiones, pero sobre todo me han inculcado los valores necesarios para seguir superándome.

ÍNDICE

Sección	Página
I. RESUMEN	9
II. ABSTRACT	10
III. INTRODUCCIÓN	11
IV. MARCO TEÓRICO	15
4.1 La producción porcina en México	15
4.2 La etapa de destete	16
4.2.1 Efectos biológicos y fisiológicos en la etapa de destete	17
4.2.2 La diarrea post destete.....	19
4.2.3 Tracto gastrointestinal durante la etapa de destete	20
4.2.4 Antimicrobianos durante la etapa de destete	21
4.3 Probióticos	22
4.3.1 Microbiota intestinal.....	24
4.3.2 Efectos benéficos de los probióticos en el hospedero.....	26
4.3.3 Mecanismos de acción de los probióticos	27
4.4 <i>Bacillus</i> como probiótico	28
4.4.1 <i>Bacillus subtilis</i> en cerdos	30
V. JUSTIFICACIÓN	35
VI. HIPÓTESIS	36
VII. OBJETIVO	37
7.1 Objetivos específicos	37

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
8.1 Obtención de <i>Bacillus subtilis</i> y cinética de crecimiento	38
8.1.1 Determinación de la viabilidad de <i>B. subtilis</i> y dosis de suplementación	40
8.2 Suplementación de <i>B. Subtilis</i> y condiciones experimentales	41
8.2.1 Colecta de muestras al sacrificio para análisis en laboratorio ...	44
8.2.2 Extracciones de ADN de contenido intestinal y cuantificación ..	44
8.2.3 Determinación de población microbiana en contenido intestinal	45
8.2.4 Determinación de genes antibióticos en <i>B. subtilis</i>	48
8.2.5 Análisis estadístico.....	49
IX. RESULTADOS.....	50
X. DISCUSIÓN	57
XI. CONCLUSIÓN	61
XII. LITERATURA CITADA.....	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1. Comparación de los resultados de diferentes experimentos realizados en cerdos suplementados con <i>B. subtilis</i>	31
Cuadro 2. Dieta experimental para cerdos 10-25kg.....	42
Cuadro 3. Protocolo de PCR tiempo real.....	46
Cuadro 4. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas con cada género bacteriano para cuantificación en PCR de tiempo real.	47
Cuadro 5. Secuencias, tamaño del producto y temperatura de alineación de los oligonucleótidos utilizados para la identificación de genes antibióticos en <i>B. subtilis</i> utilizando la técnica de PCR.	49
Cuadro 6. Incidencia de diarreas durante el período experimental.....	51
Cuadro 7. Comportamiento productivo de los cerdos en destete bajo condiciones termoneutrales durante el período experimental.....	52
Cuadro 8. Promedio del ΔC_T de amplificación de ADN para cada género de microorganismos en sección yeyuno.	53
Cuadro 9. Promedio del ΔC_T de amplificación de ADN para cada género de microorganismos en sección íleon.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Curva de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i>	39
Figura 2. Comedero, bebedero y corral en que fueron alojados los cerdos..	41
Figura 3. Variación de la humedad relativa promedio dentro de la sala en el transcurso de los días del período experimental.....	50
Figura 4. Variación de la temperatura promedio dentro de la sala en el transcurso de los días del período experimental.....	51
Figura 5. Abundancia relativa de ADN de los microorganismos detectados en sección íleon de los cerdos alimentados con dieta estándar o dieta estándar suplementada con <i>B. subtilis</i>	54
Figura 6. Abundancia relativa de ADN de los microorganismos detectados en sección yeyuno de los cerdos alimentados con dieta estándar o dieta estándar suplementada con <i>B. subtilis</i>	55
Figura 7. Fragmentos amplificados del PCR Punto Final utilizando oligonucleótidos para la detección de genes antibióticos en una muestra de ADN perteneciente a <i>Bacillus subtilis</i>	56

I. RESUMEN

Se realizó un experimento para evaluar el efecto de la suplementación con *Bacillus subtilis* a cerdos destetados. Se emplearon 14 cerdos (PV 12.93 ± 2.28 kg), asignados a dos tratamientos: 1) Testigo, dieta estándar a base de trigo; 2) Dieta estándar a base trigo suplementada con *B. subtilis* (4.5×10^{11} ufc/día) como células vegetativas. La duración del periodo experimental fue de 21 días con 10 días de adaptación. Los animales se alojaron en jaulas individuales con comederos de acero inoxidable y bebederos de chupón. El agua y alimento se ofrecieron *ad libitum*. Se evaluó la incidencia de diarreas, consumo de alimento, ganancia de peso, conversión alimenticia y abundancia relativa de ADN de bacterias de los géneros: *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* en yeyuno e íleon. La suplementación con *B. subtilis* a cerdos destetados no afectó la incidencia de diarreas, no se encontró diferencia significativa en el comportamiento productivo de los lechones salvo una tendencia a mayor consumo de alimento durante la tercer semana ($P= 0.06$) en los cerdos suplementados con *B. subtilis*. No se encontró diferencia significativa entre las poblaciones bacterianas evaluadas en yeyuno, pero en íleon la población de *Lactobacillus* se redujo de manera significativa en los cerdos suplementados con *B. subtilis* ($P= 0.01$). No se detectó *E. coli* en ninguno de los cerdos de ambos los tratamientos. *B. subtilis* no alteró ninguna de las variables de comportamiento productivo, ni en las poblaciones de microorganismos intestinales estudiados en cerdos destetados.

Palabras clave: *Bacillus*, cerdos, destete, probiótico.

II. ABSTRACT

An experiment was conducted to evaluate the effect of supplementing the diet of weaning pigs with *Bacillus subtilis*. Fourteen pigs (BW 12.93 ±2.28 kg), were divided into two treatments: 1) Control, standard wheat-based diet; 2) Standard wheat-based diet supplemented with *B. subtilis* (4.5×10^{11} cfu/day) as vegetative cells. Experimental period was 21 days, with 10 previous days for adaptation. Pigs were individually housed in pens with stainless steel feeders and suckling drinkers. Water and food were offered *ad libitum*. Evaluated variables were diarrhea incidence, feed intake, daily weight gain, feed conversion rate and relative abundance of DNA from the genera: *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium* and *E. coli* in jejunum and ileum. Diarrhea incidence was similar between treatments, no difference was found in productive parameters except a tendency to increase feed intake during the third week ($P = 0.06$) in pigs supplemented with *B. subtilis*. No difference was found in bacteria population evaluated in jejunum; but population of *Lactobacillus* in ileum was significantly reduced in pigs supplemented with *B. subtilis* ($P = 0.01$). *E. coli* was not detected in any of the pigs from both treatments. *B. subtilis* supplementation did not alter the productive performance or intestinal population of microorganisms studied in weaned pigs.

Keywords: Bacillus, pigs, probiotics, weaning.

III. INTRODUCCIÓN

En el año 2015, México ocupó el puesto número 15 en producción de carne de cerdo a nivel mundial (SIAP, 2016). No obstante, la producción nacional no cubrió la demanda de la población mexicana (CMC, 2016). Su producción en el país ha crecido a una tasa promedio anual de 2.0 por ciento solo en el período de 2006 a 2015. (DIEES, 2016).

A nivel mundial, la industria porcina se ve afectada por los altos costos de insumos para la producción y la baja cantidad de animales vivos para sacrificio (FAO, 2012). Esto se debe a los desafíos que enfrenta el animal durante su crecimiento. En un análisis de la industria Porcina en Latinoamérica (2016), México presentó el porcentaje de mortalidad más alto y el peso más bajo por animal al ser destetados (USDA-FAS, 2016).

El destete es el suceso en que el lechón es separado de su madre, lo cual genera una transición importante en su dieta al dejar de consumir alimento líquido e iniciar con el consumo de alimento sólido (Galef, 1981). La etapa de destete implica una serie de estresores (sociales, ambientales, biológicos) y desafíos que afectan directa e indirectamente el bienestar del animal, lo que resulta en un período crítico de subalimentación en el que los lechones inician un proceso de adaptación alimenticia derivado de un nuevo tipo de alimento (Dividich *et al.*, 2000). Un efecto inmediato del destete es la dramática reducción de consumo voluntario de alimento y una demora en el crecimiento del animal (Lallès *et al.*, 2004).

En la etapa de destete se aumenta la susceptibilidad a trastornos intestinales, principalmente diarreas mecánicas y algunas diarreas infecciosas (Lallès *et al.*, 2004; Williams, 2003). Lo anterior debido a que al inicio de este período, el sistema inmune del animal aun no es capaz de emitir una respuesta inmunológica lo suficientemente buena ante la

presencia de agentes patógenos o antígenos dentro de su nueva alimentación (Bailey *et al.*, 2005).

La transición que ocurre en el destete puede generar disfunción en la barrera intestinal provocando un aumento en su permeabilidad y cambios adversos en la morfología intestinal (Miller *et al.*, 1984; Kelly *et al.*, 1991; Hampson, 1986). Lo anterior tiene un impacto directo en la composición de su microbiota intestinal que incrementa la posibilidad de ser afectados por patógenos entéricos como *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (Gareau *et al.*, 2009). McCracken *et al.* (1999) demostraron que los daños ocasionados a la mucosa intestinal durante el destete tienen una estrecha relación con el bajo consumo de alimento y que tanto la inflamación como los cambios en la morfología intestinal se mejoran cuando los niveles de consumo de alimento vuelven a la normalidad.

Para subsanar la reducción en los parámetros productivos de los cerdos en crecimiento se han empleado diversas estrategias alimenticias, una de ellas es la administración de antibióticos a niveles subterapéuticos (Gibbs, 1972; Ochetim y Odur, 1978). Sin embargo, el uso excesivo de productos antimicrobianos ha provocado la aparición de cepas patógenas resistentes a antibióticos (Philips *et al.*, 2004; Gaggia *et al.*, 2010; Amezcua *et al.*, 2002), por lo que en regiones como la Unión Europea se ha prohibido completamente el uso de antibióticos en dietas para animales (Heo *et al.*, 2013).

Para mantener la rentabilidad de la industria porcina, es imperativo desarrollar un reemplazo efectivo a los antibióticos, el cual tenga un efecto semejante al de estos. El desarrollo de nuevos productos probióticos como reemplazo a los antibióticos ha recibido mucho interés durante los últimos años (Heo *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2005).

Los probióticos se definen como microorganismos viables que, al ser ingeridos en cantidades suficientes, llegan al intestino en un estado activo que los hace capaces de ejercer efectos positivos sobre la salud del hospedero (Dubreuil, 2017). Su principal aplicación es para el mantenimiento de la microbiota benéfica y la prevención de enfermedades gastrointestinales (Gaggia *et al.*, 2010).

El uso de probióticos en alimento para animales favorece su rendimiento productivo y bienestar a través de la modulación de la microbiota intestinal (Tuohy *et al.*, 2005). La microbiota intestinal brinda apoyo crítico al huésped al sintetizar vitaminas, mejorar el aprovechamiento de los ingredientes de la dieta, inactivar toxinas, recubrir el intestino con una microbiota benigna, producir antibióticos, mantener la función de barrera intestinal y promover la respuesta antiinflamatoria (Madsen *et al.*, 2001; Hooper *et al.*, 2002; Ouwehand *et al.*, 2002; Roselli *et al.*, 2007).

Los efectos más significativos que han sido reportados por la aplicación de probióticos han ocurrido en períodos de estrés para el animal y para su microbiota intestinal, situación que se vive en el destete (Chaucheyras-Durand y Durand, 2010). Entre los beneficios de manera general se ha encontrado una mejora en el comportamiento productivo y una reducción en la incidencia de diarreas durante el destete (Giang *et al.*, 2012).

Varios mecanismos han sido propuestos para explicar los beneficios generados en el uso probióticos y es probable que los resultados positivos que se han reportado en diferentes estudios animales se deban a la combinación de estos efectos y no a uno solo en específico (Chaucheyras-Durand y Durand, 2010).

Los probióticos más utilizados han sido bacterias del tipo ácido láctico (LAB), *Bacillus* y levaduras (Allen *et al.*, 2013). Sin embargo, los efectos probióticos son específicos de la cepa utilizada (Weichselbaum, 2009).

El uso de especies de *Bacillus* como probiótico en dietas animales se ha expandido rápidamente con la publicación de numerosos estudios reportando sus efectos benéficos, tales como estimulación del sistema inmunológico, actividad antimicrobiana y exclusión competitiva. Esto demuestra que este tipo de bacterias son capaces de crecer dentro del tracto gastrointestinal y han sido consideradas residentes temporales del mismo (Cutting, 2011).

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 La producción porcina en México

El cerdo es uno de los animales con mejor eficiencia en la producción de carne; debido a una serie de ventajas como su gran precocidad, prolificidad, corto ciclo reproductivo y una destacable capacidad transformadora de nutrientes (Benítez *et al.*, 2000).

En el 2015, México ocupó el puesto número 15 en la producción de carne de cerdo a nivel mundial (SIAP, 2016), esto implicó el sacrificio de 15.56 millones de cabezas porcinas. No obstante, la producción nacional no cubrió la demanda de la población por lo que fueron importadas 723 mil toneladas de carne de cerdo (CMC, 2016). A su vez, el consumo per cápita estimado de carne porcina en el 2015 fue de 17.6 kg, lo cual representa un 27 por ciento del consumo per cápita total de carne en el país (SIAP, 2016).

En México, la producción de carne porcina ha crecido a una tasa promedio anual de 2.0 por ciento solo en el período de 2006 a 2015. Se pronostica que la producción nacional de carne de cerdo durante 2016 se ubique en 1.36 millones de toneladas, lo cual indicaría un crecimiento anual de 3.2 por ciento (DIEES, 2016). Sin embargo, para el 2016 también se pronosticó que el consumo nacional aparente de carne de cerdo se ubique en 1.98 millones de toneladas (SIAP, 2016), tal diferencia entre producción y consumo refleja importaciones que ascienden hasta 600 mil toneladas de carne de cerdo durante ese mismo año.

En el 2012, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) reportó que el incremento generalizado de los precios en carne es consecuencia de los altos costos de insumos para la producción y el bajo número de animales vivos para sacrificio (FAO, 2012).

El bajo número de animales vivos para sacrificio se debe a los desafíos que se enfrenta el animal en las distintas fases de crecimiento,

principalmente en maternidad y destete. En un análisis de la industria porcina en Latinoamérica (2016), México presentó el porcentaje de mortalidad más alto de este grupo de países, indistintamente de la fase de crecimiento evaluada, y el peso promedio por cerdo al salir de la etapa de destete fue de 21.8kg, debajo del promedio general (24.9 kg) y muy por debajo de Argentina, quien ocupó el primer puesto con 32.56 kg (USDA-FAS, 2016).

4.2 La etapa de destete

El destete es el suceso en que el lechón es separado de su madre, lo cual genera una fuerte transición en la dieta del animal; pasa de consumir leche materna a consumir alimento sólido (Galef, 1981). Tal período tiene una duración de entre 7 y 10 semanas (DIEES, 2016). En la producción comercial de cerdos, la mayoría de las tensiones por estrés en los animales ocurren durante la etapa de destete (Gaggia *et al.*, 2010).

La etapa de destete implica una serie de estresores y desafíos que afectan directa e indirectamente la salud del animal, entre ellos: estrés social (en la convivencia con lechones de diferentes camadas), estrés ambiental (al ser transportados a un ambiente diferente ya sea corral o sala), incremento de su exposición a patógenos y cambios agudos tanto en el patrón de ingesta como en el tipo de dieta. Esta transición tiene efectos inmediatos en su crecimiento y metabolismos como el energético u otros más asociados con ajustes endocrinos (Dividich *et al.*, 2000). El lechón debe adaptarse rápidamente a todos estos factores que le inducen estrés para ser productivo y eficiente. Cuando el nivel de estrés es mayor al que el lechón es capaz de superar, su rendimiento productivo es pobre y en algunos casos se presenta la muerte (Campbell *et al.*, 2013).

Un efecto inmediato del destete es la dramática reducción de consumo voluntario de alimento, lo cual genera una demora en el crecimiento del animal (Lallès *et al.*, 2004). Independientemente de la edad a la que se destete al cerdo, éste pierde de 100 a 250 gramos de peso en el primer día, pérdida que se recupera en un rango de 2 a 4 días; sin embargo esto ralentiza el ritmo de crecimiento del animal durante las siguientes semanas (Dividich *et al.*, 2000). La ganancia diaria de peso durante la primera semana de destete tiene un alto impacto en el desempeño del animal durante las etapas de crecimiento y finalización (Tokach *et al.*, 1992), esta baja ganancia diaria tiene origen en el reducido consumo de alimento que a su vez puede relacionarse con la incidencia de enfermedades durante esta etapa (Madec *et al.*, 1998).

Durante el destete se observa mayor susceptibilidad a trastornos intestinales, infecciones y diarreas. En esta etapa se incrementa la exposición a antígenos ambientales derivados de alimentos y organismos potencialmente patógenos, mismos que activan el sistema inmune de los animales (Lallès *et al.*, 2004; Williams, 2003). Williams *et al.* (1997) demostraron que cuando el sistema inmune es activado se reduce el crecimiento, el consumo de alimento, la eficiencia de la alimentación y la acumulación de tejido magro. Por lo tanto, la mitigación del estrés durante la etapa de destete es crítica para mejorar la producción porcina.

Mejoras tecnológicas, de alojamiento, nutrición, salud y manejo han sido utilizadas para minimizar los efectos adversos del estrés ocurrido en el destete, pero es necesaria una mayor comprensión del impacto biológico que este genera (Campbell *et al.*, 2013).

4.2.1 Efectos biológicos y fisiológicos en la etapa de destete

El período de destete es una etapa crítica en la vida del cerdo ya que su sistema inmune aún no se ha desarrollado lo suficiente para responder

ante situaciones de estrés. Esta inmadurez reduce la capacidad del lechón recién destetado para montar una respuesta inmunológica ante agentes patógenos o a la presencia de antígenos en su nuevo tipo de alimentación (Bailey *et al.*, 2005).

Además, el destete puede acompañarse por cambios adversos en la morfología intestinal, como reducción en la altura de las vellosidades, aumento del ancho de las vellosidades, aumento de la profundidad de las criptas y reducción en la capacidad de absorción (Miller *et al.*, 1984; Hampson, 1986; Kelly *et al.*, 1991). Estrés psicológicos y fisiológicos generan disfunción en la barrera intestinal provocando aumento en su permeabilidad, esto tiene un impacto directo en la composición de su microbiota intestinal e incrementa la posibilidad de ser afectados por patógenos entéricos (Gareau *et al.*, 2009). Los patógenos intestinales producen toxinas y otra clase de sustancias como mucinasas, adhesinas e invasinas, las cuales interfieren con el metabolismo epitelial. La presencia de este conjunto suele dar origen a inflamación e incremento de la población de bacterias nocivas y disminución de las benéficas dentro de la microbiota intestinal (Andoh *et al.*, 2006). McCracken *et al.* (1999) demostraron que los daños ocasionados a la mucosa intestinal durante el destete tienen una estrecha relación con el bajo consumo de alimento y que tanto la inflamación como los cambios en la morfología intestinal se mejoran cuando los niveles de consumo de alimento vuelven a la normalidad.

Las infecciones gastrointestinales, a pesar de la existencia de numerosas alternativas terapéuticas, siguen siendo un problema clínico importante, tanto en el hombre como en los animales (Dubreuil, 2017). El control temprano de los trastornos intestinales es crucial, debido a que de no llevarse a cabo los animales se vuelven más propensos a contraer

diarreas causadas por agentes patógenos, tales como *E. coli* enterotoxigénica (ETEC; Bailey, 2009).

Los cambios en la composición de la dieta de los cerdos en destete también son causa de las alteraciones a la microbiota intestinal (Janczyk *et al.*, 2007). Varios lactobacilos potencialmente benéficos son suprimidos de manera significativa durante la transición del destete, posiblemente a causa de que los lactobacilos tienen requisitos nutricionales más complejos (Inoue *et al.*, 2005). La inestabilidad de la microbiota y la disminución rápida de lactobacilos previamente predominantes puede tener una mayor contribución a los problemas intestinales (Lallès *et al.*, 2004; Inoue *et al.*, 2005), es por ello que la microbiota intestinal es vista como un objetivo importante y con mucho potencial en las intervenciones dietéticas dirigidas a contrarrestar las alteraciones del tracto gastrointestinal.

Sin importar la edad a la que se destete el animal, mientras suceda en un rango de 7 a 35 días después del nacimiento, se ha observado un aumento transitorio en la concentración de cortisol en plasma (Dantzer y Morme, 1981; Carroll *et al.*, 1998) o de excreción de cortisol en la orina (Kanitz *et al.*, 1996) durante los primeros dos días posteriores al destete, lo cual es un indicador del estrés que vive el animal durante esta dura etapa.

4.2.2 La diarrea post destete

La diarrea post-destete genera grandes pérdidas económicas en la producción porcina (Hampson, 1994; Madec *et al.*, 2000). Ocurre con mayor frecuencia dentro de las dos primeras semanas posteriores al destete y se caracteriza por diarrea profusa, deshidratación, mortalidad significativa y pérdida de peso corporal de los lechones sobrevivientes (Fairbrother *et al.*, 2005). La mortalidad asociada a esta condición alcanza

niveles de entre 20 y 30% en un plazo de 1 a 2 meses en cerdos infectados (Amezcuca *et al.*, 2002).

La incidencia de diarrea post-destete es mayor en granjas con restricción de alimento que en granjas donde el alimento se administra de manera *ad libitum* (a voluntad) (Laine *et al.*, 2008). Esto coincide con el hecho de que la reducción de disponibilidad de nutrientes en el tracto gastrointestinal influye negativamente la estabilidad de la microbiota intestinal (Lallès *et al.*, 2004).

4.2.3 Tracto gastrointestinal durante la etapa de destete

El intestino es el compartimiento del tracto gastrointestinal donde ocurre la digestión y absorción de nutrientes e intercambio hídrico y mineral. La mucosa alberga una microbiota compleja y un sistema inmune altamente evolucionado. Sin embargo no se encuentra exento de los trastornos provocados por la etapa de destete que afectan de manera significativa su arquitectura, sus funciones y su microbiota autóctona (Lallès *et al.*, 2004). El intestino delgado y su mucosa pierden entre 20 y 30 % de su peso durante los primeros dos días de destete, mientras que su regeneración puede tomar de 5 a 10 días para una recuperación completa (Spreeuwenberg, 2002).

Durante la etapa de destete, el pH gástrico es alto (~ 5), debido a que a su temprana edad la secreción de ácido en el estómago es muy baja y la producción de ácido láctico se reduce al dejar de recibir lactosa por parte de la madre (Manners, 1976; Efird *et al.*, 1982). El fracaso en la acidificación del estómago, el cual es el primer mecanismo de defensa ante el ingreso de microorganismos patógenos, aumenta la probabilidad de colonización de nuevos organismos, incluidos algunos potencialmente patógenos dentro del tracto gastrointestinal (Heo *et al.*, 2013).

En caso de presentarse, las infecciones de carácter entérico durante el destete, estas deprimen la actividad de algunas enzimas intestinales (Mroz *et al.*, 2003), lo cual podría repercutir directamente en la digestión y absorción de nutrientes, característica que se refleja en la reducción de los parámetros productivos durante esta etapa.

4.2.4 Antimicrobianos durante la etapa de destete

Los antibióticos se han administrado tradicionalmente en dosis sub-terapéuticas como promotores de crecimiento en cerdos (Gibbs, 1972; Ochetim y Odur, 1978), y en dosis elevadas para resolver problemas infecciosos que se generen al momento del destete (Kong *et al.*, 2009). Sin embargo, la suplementación con antibióticos en el alimento a niveles sub-terapéuticos se ha considerado un factor importante para la aparición de cepas microbianas patógenas con resistencia a antibióticos (Philips *et al.*, 2004).

Debido a que el uso frecuente de antibióticos ha generado la aparición de cepas bacterianas resistentes a antibióticos (Amezcuca *et al.*, 2002), en enero del 2006, la Unión Europea (UE) implementó una prohibición total del uso de antibióticos en la alimentación animal (Heo *et al.*, 2013). Desde entonces, países como China, Corea y Estados Unidos han propuesto la prohibición de los antibióticos dentro de las dietas para animales (Martin *et al.*, 2015; Lusk *et al.*, 2006), mientras que en México poco se ha debatido al respecto. Sin embargo, esta prohibición ha impactado negativamente la producción animal, y ha resultado en una mayor demanda de antibióticos para combatir una mayor incidencia de infecciones (Stanton, 2013). Basado en esta experiencia, en la industria porcina se ha tenido que incrementar la edad requerida para destete y se ha reducido el número de cerdos destetados por cerda por año (Hayes *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002). Estos sucesos justifican la búsqueda de alternativas que puedan mejorar

el estado de salud de los cerdos para minimizar el uso de antibióticos (Giang *et al.*, 2012).

Para mantener la rentabilidad de la industria porcina, es imperativo encontrar un reemplazo efectivo de los antibióticos como promotores de crecimiento, y para reducir la incidencia y gravedad de problemas digestivos asociados a la etapa post-destete (Heo *et al.*, 2013). Una alternativa viable que está recibiendo gran interés en la producción animal es el desarrollo de nuevos probióticos (Hong *et al.*, 2005). En este sentido, un gran número de reportes han demostrado que los probióticos pueden actuar igual o de mejor manera que los antibióticos empleados en la producción porcina (Wang *et al.*, 2017).

4.3 Probióticos

Los probióticos se definen como microorganismos viables que, al ser ingeridos en cantidades suficientes, llegan al intestino en un estado activo que los hace capaces de ejercer efectos positivos sobre la salud del hospedero (FAO/OMS, 2002; Dubreuil, 2017). La cepa de microorganismos utilizada como probiótico debe originarse preferentemente de la especie huésped objetivo, ya que esto asegura su capacidad de supervivencia y colonización en el animal (Dubreuil, 2017).

Los probióticos son cultivos vivos de bacterias o levaduras inofensivas a la salud del hospedero que equilibran su microflora intestinal y brindan beneficios a su salud. Algunos ejemplos más conocidos son los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Saccharomyces* (Fuller, 1989; Ferencik *et al.*, 2000). Su principal aplicación es la prevención de infecciones y enfermedades gastrointestinales, más que un enfoque curativo. Esto se debe a que la acción de los probióticos no está dirigida precisamente a suprimir las bacterias patógenas como en el caso de los antibióticos, sino

a modular el entorno gastrointestinal reduciendo el riesgo de enfermedades de manera sinérgica con el sistema inmune del huésped (Gaggia *et al.*, 2010). Muchos estudios realizados en varias especies animales han indicado que existe un rol benéfico de parte de los probióticos en contra de las enfermedades; como ejemplo, han sido capaces de controlar algunos trastornos ocasionados por *E. coli* (Khajareen y Khajareen, 1994; Zani *et al.*, 1998; Kyriakis *et al.*, 1999).

Para que los probióticos puedan ser efectivos, las cepas a utilizar deben poseer algunas características básicas. Deben ser capaces de resistir el ácido gástrico, las sales biliares y las enzimas pancreáticas. También deben poder adherirse a la mucosa intestinal para lograr colonizar el tracto digestivo. La elección de una cepa probiótica, la edad del animal, el tiempo de administración y la dosis utilizada son factores fundamentales para obtener resultados favorables en su uso (Dubreuil, 2017). Los microorganismos con potencial probiótico deben ser evaluados en estudios *in vitro* previo a la realización de ensayos *in vivo* (Rajilić-Stojanović *et al.*, 2012).

El uso de probióticos específicos en dietas para animales afecta favorablemente el rendimiento y bienestar de los mismos, en particular a través de la modulación de la microbiota intestinal, que desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la salud del huésped (Tuohy *et al.*, 2005). La salud intestinal puede ser mejorada mediante el uso de probióticos que estimulen el desarrollo de una microbiota saludable en la que predominen las bacterias benéficas, mismas que evitan la colonización de bacterias patógenas en el intestino, aumentan la capacidad digestiva y mejoran la inmunidad de la mucosa (De Lange *et al.*, 2010; Choct, 2009).

Varios mecanismos han sido propuestos para explicar los efectos benéficos de los probióticos y es probable que los resultados positivos que se han reportado en diferentes estudios con animales se deban a la

combinación de todos ellos y no a uno solo en específico (Chaucheyras-Durand y Durand, 2010).

Está bien documentado que los probióticos pueden servir como alternativa al uso de antibióticos para mejorar el comportamiento productivo de los cerdos en destete (Kritas y Morrison, 2005). Los probióticos utilizados han sido bacterias del tipo ácido lácticas (LAB), *Bacillus* y levaduras como suplementos alimenticios microbianos (Allen *et al.*, 2013). Sin embargo, la eficacia de los probióticos es específica de la cepa utilizada, lo que implica que cada cepa o combinación de cepas debe ser estudiada para evaluar potenciales beneficios en el huésped (Weichselbaum, 2009).

La mayoría de los microorganismos probióticos utilizados en humanos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Para animales monogástricos, además de los humanos, los probióticos abarcan levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* y bacterias de los géneros: *Enterococcus spp.*, *Pediococcus spp.*, y *Bacillus spp.* (Chaucheyras-Durand y Durand, 2010; Anadon *et al.*, 2006).

4.3.1 Microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal tanto de humanos como de animales, alberga una población compleja y dinámica de microorganismos a la que llamamos microbiota intestinal (Thursby y Juge, 2017).

En mamíferos, la microbiota intestinal se compone de hasta por 10^{14} bacterias (Luckey, 1972; Savage 1977). Esto es al menos diez veces mayor al número total de células eucariotas que componen al mamífero promedio. Se estima que el genoma colectivo de esta población bacteriana que habita a los mamíferos contiene hasta 3 millones de genes (Qin *et al.*, 2010) mientras que el genoma humano contiene aproximadamente 23 mil genes

(International Human Genome Sequencing Consortium, 2004), por lo tanto, la diversidad genética de la microbiota dentro del tracto gastrointestinal provee de numerosas actividades biológicas que el huésped carece (Isaacson y Bum, 2012). Por este motivo, la microbiota intestinal ha sido considerada un órgano metabólicamente activo (Macfarlane y Macfarlane, 2004; Backhed *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2009).

La microbiota endógena brinda apoyo crítico al huésped en áreas como producción de vitaminas y cofactores (componentes no proteínicos necesarios para accionar una enzima), uso de ingredientes de alimentos que no son digeribles por el huésped, desintoxicación de componentes alimenticios, recubrimiento del intestino con una microbiota benigna para excluir físicamente patógenos, producción de antibióticos naturales y antifúngicos, mantenimiento de la función de barrera intestinal y promoción de la respuesta antiinflamatoria (Madsen *et al.*, 2001; Hooper *et al.*, 2002; Ouwehand *et al.*, 2002; Roselli *et al.*, 2007).

Los animales criados en ambientes con ausencia de bacterias han mostrado un profundo retraso en el desarrollo de la morfología intestinal y en el desarrollo de su función inmune (Wagner, 2008; Nanthakumar *et al.*, 2003). En los animales sanos y normales, el equilibrio de microorganismos en su tracto gastrointestinal ayuda a obtener una digestión eficiente, a la absorción máxima de nutrientes y aumenta la resistencia del cuerpo a las enfermedades infecciosas (Riise, 1981; Tannock, 1988). Durante períodos de estrés, este equilibrio puede ser alterado, lo que generalmente resulta en reducción de la población de lactobacilos en el tracto gastrointestinal, esto puede permitir la multiplicación de otros microorganismos. Un crecimiento excesivo de microorganismos patógenos puede dar lugar a la aparición de trastornos gastrointestinales (Fox, 1988).

Después del nacimiento, los cerdos desarrollan rápidamente y establecen su microbiota. Los primeros microorganismos que colonizan su

tracto gastrointestinal son los que encuentran en el ambiente y se desarrollan durante los primeros días, siendo la madre el principal aportador de estos microorganismos (Haoe y Lee, 2004). El establecimiento de la microbiota intestinal está influenciado por muchos factores como el pH intestinal, la disponibilidad de sustratos, la secreción de moco y el tiempo de tránsito a lo largo del tracto gastrointestinal (Haoe y Lee, 2004; O'Sullivan *et al.*, 2005).

El desarrollo de la microbiota también es afectado por el genotipo del huésped, así como los factores ambientales, incluyendo el tracto gastrointestinal materno, la microbiota asociada con el consumo de leche y la dieta recibida después del destete (Bauer *et al.*, 2006).

4.3.2 Efectos benéficos de los probióticos en el hospedero

La modulación de la inmunidad del huésped es uno de los beneficios de salud más comúnmente atribuidos al consumo de probióticos (Cross, 2002). La selección de probióticos a los que se les conoce algún tipo de protección contra patógenos microbianos ha asociado con su capacidad de estimular la secreción de anticuerpos, así como respuestas inmunitarias mediadas por las células (Cross, 2002).

Los efectos más significativos que han sido reportados por el uso de probióticos en la dieta, han ocurrido durante períodos de estrés para el animal y para su microbiota intestinal, como ejemplos: en el destete, al inicio del período de lactancia y después de fuertes cambios en el nivel de digestibilidad del alimento (Chaucheyras-Durand y Durand, 2010).

Muchos estudios han reportado que la suplementación con probióticos mejora el comportamiento productivo de los cerdos y reduce la incidencia de diarreas durante la etapa de destete (Giang *et al.*, 2012). Otros efectos como prevención de la pérdida en la integridad de la barrera intestinal

(Yang *et al.*, 2016), reducción de la severidad de diarrea postdestete (Trckova *et al.*, 2014), reducción en la presencia de *E. coli* enterotoxigénica (Daudelin *et al.*, 2011) e incremento en la población benéfica de la microbiota (Ozawa *et al.*, 1981) han sido reportados en la literatura al evaluar el uso de los probióticos.

En contraste, otros investigadores han intentado demostrar los efectos benéficos de la administración directa de microorganismos benéficos sin éxito (De Cupere *et al.*, 1992; Kritas y Morrison, 2005). Es posible que muchos de los ensayos realizados para la evaluación de la administración directa de estos microorganismos no estén siendo reportados en la literatura científica debido al poco o nulo éxito obtenido, de modo que la literatura publicada tiende a apoyar la idea de que los probióticos son efectivos en la dieta del animal (LeJeune *et al.*, 2006).

4.3.3 Mecanismos de acción de los probióticos

Los probióticos proveen beneficios a la salud intestinal del huésped a través de un diverso conjunto de mecanismos que incluyen exclusión de patógenos por competencia, producción de compuestos antimicrobianos, inactivación de enterotoxinas, modulación de las respuestas inmunes del hospedero y mantenimiento en la integridad de la barrera intestinal (Dubreuil, 2017).

La producción de compuestos antimicrobianos es considerada uno de los principales mecanismos que inhiben la colonización de microorganismos patógenos dentro del tracto gastrointestinal. El efecto de estos compuestos *in vivo* aun no es bien entendido, no se puede asumir que los efectos detectados al realizar evaluaciones *in vitro* sucederán de la misma manera en el tracto gastrointestinal del huésped (Urdaci *et al.*, 2004).

La liberación de enzimas capaces de hidrolizar las toxinas sintetizadas por cepas patógenas es otro de los mecanismos utilizado por los probióticos (Buts, 2004).

Otro mecanismo de acción de las cepas probióticas es la modulación del sistema inmune del hospedero (Roselli *et al.*, 2006). Se ha reportado que son capaces de incrementar la producción de anticuerpos y la activación de linfocitos (Ng *et al.*, 2009). Los probióticos reducen la translocación bacteriana a través de interacciones con el epitelio intestinal y células inmunocompetentes que contribuyen de manera positiva en la función de barrera de las paredes intestinales (Lessard *et al.*, 2009), esto al modular el citoesqueleto y la fosforilación de las proteínas de unión estrecha (Sherman *et al.*, 2005).

Algunos probióticos producen nutrientes y factores de crecimiento que funcionan como estimulantes a los microorganismos benéficos que ya son parte de la microbiota intestinal (Delcenserie *et al.*, 2008). Algunas cepas excluyen a las bacterias patógenas debido a su mayor afinidad por los sitios de adhesión que ocupan dentro del tracto gastrointestinal (La Ragione *et al.*, 2004).

4.4 *Bacillus* como probiótico

El género *Bacillus* está conformado por bacterias gram positivas, espora formadoras, comúnmente asociadas con suelo, agua y aire (Sanders *et al.*, 2003). Son alóctonas (no originarias) al tracto intestinal, sin embargo una cuidadosa revisión de literatura revela que este género ha sido encontrado comúnmente en el intestino de distintos animales e insectos (Hong *et al.*, 2005).

El uso de especies de *Bacillus* como probiótico en la dieta se ha expandido rápidamente con la publicación de numerosos estudios que han

reportado sus efectos benéficos, como estimulación inmune, actividad antimicrobiana y exclusión competitiva. Estas bacterias son capaces de crecer dentro del tracto gastrointestinal y han sido consideradas residentes temporales del mismo (Cutting, 2011).

Se ha especulado que los efectos benéficos en el comportamiento productivo al administrar *Bacillus* pueden deberse a su capacidad de producir enzimas degradadoras de fibra, por lo que al desarrollarse dentro del tracto gastrointestinal, se incrementa la disponibilidad de energía en la dieta del animal (Davis *et al.*, 2008).

El género *Bacillus* produce un gran número de compuestos antimicrobianos. Estos incluyen bacteriocinas y otras sustancias inhibitorias parecidas (ej., subtilina y coagulina), así como antibióticos (ej., surfactina, iturina A, C, D, E, y bacilisina; Urdaci *et al.*, 2004). Caldini *et al.* (2002) plantearon un nuevo mecanismo probiótico en este género de bacterias al descubrir que distintas especies (*B. subtilis*, *B. firmus*, *B. megaterium* y *B. pumilus*) son capaces de convertir compuestos genotóxicos a productos no reactivos, sin embargo esto se llevó a cabo de manera *in vitro* por lo que su ocurrencia dentro del intestino aún sigue permaneciendo en duda (Cadini *et al.*, 2002).

Varias especies espora formadoras del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. cereus var. toyoi*) han sido utilizadas en la industria porcina (Kenny *et al.*, 2011). Una gran cantidad de suplementos dietéticos preparados a base de *Bacillus* han mostrado mejoras en crecimiento, aprovechamiento del alimento y salud digestiva (Gaggia *et al.*, 2010; Novak *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2010). La actividad inhibitoria de *Bacillus* frente a bacterias patógenas (*E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* y *C. perfringens*) resultó ser específica de la especie y cepa que se esté utilizando, de acuerdo a estudios anteriormente realizados (Abriouel *et al.*, 2011; Borriss *et al.*, 2011; Kabore *et al.*, 2012).

4.4.1 *Bacillus subtilis* en cerdos

Bacillus subtilis cuenta con las características microbiológicas de su género y es capaz de crecer bajo las condiciones ambientales del tracto gastrointestinal afectando de manera positiva el metabolismo del huésped (Mazza, 1994).

Distintos ensayos en cerdos utilizando *B. subtilis* han demostrado algunos de sus efectos benéficos. Bhandari *et al.* (2008) incluyeron una cepa de *B. subtilis* dentro de la dieta para cerdos en destete que luego fueron expuestos a un desafío con *E. coli* enterotoxigénica y reportaron que las diarreas se redujeron significativamente después de 24 horas para el grupo de cerdos que fue administrado con *B. subtilis*.

Otros efectos benéficos que comúnmente se reportan en los ensayos realizados con *B. subtilis* en cerdos destetados son mejoras en el comportamiento productivo (Alexopoulos *et al.*, 2004a; Hu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2011); incremento en la población de bacterias ácido lácticas (Ozawa *et al.*, 1981; Hu *et al.*, 2014); y disminución de la población de *E. coli* (Guo *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2014). Además, *Bacillus subtilis* puede aumentar la disponibilidad de energía metabólica en la dieta ya que es capaz de producir enzimas hidrolíticas como α -amilasa, arabinasa, celulasa, dextranasa, levansucrasa, maltasa, proteasa alcalina, proteasa neutral y β -glucanasa (Priest, 1977). El cuadro 1 muestra algunos de los resultados de experimentos realizados empleando *B. subtilis* y otras especies de *Bacillus* como probiótico en cerdos.

Cuadro 1. Comparación de los resultados de diferentes experimentos realizados en cerdos suplementados con *B. subtilis*.

Etapa de gestación-lactancia					
Autor	Peso/Edad	Cepa	Dosis UFC	Resultados	Duración
Baker A.A., 2013	Cerdas gestantes	<i>B. subtilis</i>	3.75x10 ⁵ por gramo de alimento (consumo promedio de 5.5kg de alimento al día)	<ul style="list-style-type: none"> Resultados en lechones Mayor peso al destete Tendencia a mejorar ganancia de peso de la camada Más lechones destetados Mayor población de <i>Lactobacillus</i> en ileon y colon al día 3 de lactancia. Reducción de la población de <i>E. coli</i> en colon al día 3 de lactancia. Incremento en la población de <i>Lactobacillus</i> en colon al día 10 de lactancia. Tendencia a reducir la población de <i>C. perfringens</i> al día 10 de lactancia. 	Desde 6 semanas antes del parto hasta terminar periodo de lactancia.
Alexopoulos C., 2004	Cerdas gestantes	<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i> (1:1)	1.28x10 ⁶ por gramo de alimento	<ul style="list-style-type: none"> Mayor consumo de alimento en cerdas en los primeros 14 días post parto Menor pérdida de peso en cerdas durante la lactancia Mayor concentración de colesterol y lípidos totales en suero Mayor contenido de grasa y proteína en leche a la mitad de la lactancia Menor incidencia de diarreas en los lechones Menor mortalidad de lechones pre-destete Más lechones destetados por camada Mayor peso de lechones al destete 	14 días previos al parto hasta día de destete

Maruta <i>et al.</i> , 1996	Cerdas gestantes (primíparas y multíparas)	<i>B. subtilis</i>	1x10 ⁷ por gramo de alimento a multíparas y primíparas	<ul style="list-style-type: none"> Mayor población de <i>Bifidobacterium</i> Menor población de <i>Streptococcus</i> y <i>Clostridium perfringens</i> 	3 semanas
Etapas de lactancia					
Deng <i>et al.</i> , 2013	Recién nacidos	<i>B. subtilis</i> RUGP16	5x10 ⁹ UFC/ml 1 ml en día 0 2 ml en día 7 3 ml en día 11	<ul style="list-style-type: none"> Mayor expresión de citocina IL-6 en duodeno, citocina IL-1b en ileon, TLR-2 en duodeno e ileon. Mayor expresión de proteínas TLR-2 en duodeno e ileon. 	28 días (destete a los 21 días)
		<i>B. subtilis</i> RUGP16 + <i>L. salivarius</i> B1	2.5x10 ⁹ UFC/ml de RUGP16 2.5x10 ⁹ UFC/ml De B1 1 ml en día 0 2 ml en día 7 3 ml en día 11	<ul style="list-style-type: none"> Mayor expresión genes citocina IL-6 en duodeno e ileon, TLR-2 en duodeno e ileon y pBD-2 en duodeno. Mayor expresión de proteínas TLR-2 en duodeno e ileon. 	
Etapas de destete					
Hu Yuangliang, 2014	7.14 ±0.63 kg	<i>B. subtilis</i> KN-42	2x10 ⁹ por kg alimento 4x10 ⁹ por kg alimento	<ul style="list-style-type: none"> Menor índice de diarrea Bajo índice de diarrea Mayor ganancia diaria y mejor conversión Mayor diversidad de bacterias en flora intestinal 	28 días
			2x10 ¹⁰ por kg alimento	<ul style="list-style-type: none"> Bajo índice de diarrea Mayor ganancia diaria y mejor conversión 	

				<ul style="list-style-type: none"> • Mayor población de <i>Lactobacillus</i> • Menor población de <i>E. coli</i> 	
Ozawa, 1981	30 días	<i>B. subtilis</i> BN	1x10 ⁶ por gramo de alimento	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor población de <i>Streptococcus</i> y <i>Bifidobacterias</i> en región proximal de intestino delgado 	1 semana de adaptación y 3 de tratamiento
			5x10 ⁴ por gramo de alimento	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor población de bacterias ácido lácticas 	
Guo, 2006	35-40 días de nacidos	<i>B. subtilis</i> MA139	2.2x10 ⁵ por gramo de alimento	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor ganancia diaria de peso y conversión alimenticia • Mayor población de <i>Lactobacillos</i> en heces • Menor población de <i>E. coli</i> en heces • Mayor ganancia diaria de peso y mejor conversión alimenticia 	28 días
			2.2x10 ⁶ y 2.2x10 ⁷ por gramo de alimento	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor consumo y mejor conversión alimenticia • Menor concentración de IgG y IgM en suero 	23 días
Wang, 2011	5.8 kg 21 días	<i>B. subtilis</i> M-1	1x10 ¹¹ por kilogramo de alimento		
Etapa destete-finalización					
Cui C., 2013	10.28 +- 0.59 kg hasta su sacrificio a los 110kg	<i>B. subtilis</i>	4x10 ¹¹ cfu/kg de alimento	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor ganancia diaria de peso y conversión alimenticia • Incremento en profundidad grasa dorsal • Menor concentración de triglicéridos y glucosa en suero • Regulación de la expresión de ácido graso sintetasa y acetil-CoA carboxilasa A en hígado • Menor porcentaje de <i>Bacteroidetes</i> al mismo tiempo y mayor de <i>Firmicutes</i> en ciego 	Desde dos semanas de destete hasta el sacrificio.

Alexopoulos C., 2004	Destetados a los 26 días hasta sacrificio (95-100 kg) 121 a 159 d estuvieron sin probiótico	<i>B. subtilis</i> DSM 5750 + <i>B. licheniformis</i> DSM 5749 (1:1)	1.28x10 ⁶ por gramo de alimento Solo durante etapa destete (26-61 días)	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor ganancia diaria y conversión alimenticia en destete • Menor porcentaje y mortalidad por diarrea 	De Febrero a Julio (2002)
Etapas de finalización					
Chen Y.J., 2005	90.60 kg	<i>B. subtilis</i> <i>B. coagulans</i> <i>L. acidophilus</i>	<i>B. subtilis</i> 1x10 ⁷ <i>B. coagulans</i> 2x10 ⁶ <i>L. acidophilus</i> 5x10 ⁶ por kg de alimento	<ul style="list-style-type: none"> • Menor concentración de ácido butírico en heces 	6 semanas
			<i>B. subtilis</i> 2x10 ⁷ <i>B. coagulans</i> 4x10 ⁶ <i>L. acidophilus</i> 1x10 ⁷ por kg de alimento	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor ganancia diaria • Reducción en amoniaco fecal • Menor concentración de ácido butírico en heces 	

V. JUSTIFICACIÓN

El desafío al que se enfrentan los cerdos durante el destete provoca pérdidas económicas a la industria porcina. La suplementación con probióticos en la dieta ha demostrado beneficios en la salud intestinal del animal y por tanto en su comportamiento productivo. Es importante iniciar el desarrollo de este tipo de suplementos con origen autóctono a la región para garantizar su eficacia en la aplicación.

VI. HIPÓTESIS

La suplementación con cultivo de *Bacillus subtilis* mejorará el comportamiento productivo y estabilidad de la microbiota intestinal en cerdos destetado.

VII. OBJETIVO

Evaluar el efecto de la suplementación con *Bacillus subtilis* sobre el comportamiento productivo y la estabilidad de la microbiota intestinal de cerdos destetados.

7.1 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la suplementación con *Bacillus subtilis* sobre el comportamiento productivo de cerdos destetados.
2. Evaluar el efecto de la suplementación con *Bacillus subtilis* sobre la estabilidad de la microbiota intestinal de cerdos destetados.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1 Obtención de *Bacillus subtilis* y cinética de crecimiento

La cepa de *Bacillus subtilis* empleada en este trabajo fue aislada del intestino delgado de cerdos que se encontraban adaptados a las condiciones climáticas de la zona y que por lo tanto mostraban un comportamiento productivo regular. Esta cepa fue aislada en cultivo en caja Petri y posteriormente identificada con un PCR de punto final utilizando oligonucleótidos universales de 16S. El producto amplificado fue secuenciado y su secuencia de ADN fue comparada en el GenBank, dando una homología mayor a 99.99 % con *Bacillus subtilis*.

Posteriormente se incubaron 200 µl de inóculo *Bacillus subtilis* en 200 ml de medio LB durante 16 horas a 37 °C, en agitación (250 rpm). Una vez cumplidas las 16 horas del cultivo se realizaron alícuotas de bacteria adicionando 30% de glicerol como conservador (700 µl de bacteria en cultivo más 300 µl de glicerol en tubos de 1.5 ml). Las alícuotas fueron homogenizadas y conservadas en ultracongelador a -80 °C (Sambrook y Russell, 2006).

Se analizó la cinética de crecimiento de la bacteria mediante una curva de crecimiento. La curva de crecimiento se inició con 200 µl de bacteria inoculada en 200 ml de medio LB y mantenida en incubación a 37 °C en agitación (250 rpm). Cada hora se tomó una muestra del cultivo y en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Helios Beta, Massachusetts, United States) se leyó su densidad óptica a 540 nm (nanómetros). Para la lectura en espectro se realizó una dilución de 200 µl de cultivo en 800 µl de agua destilada (Factor de dilución = 5); el producto homogenizado fue leído en celdas de metacrilato desechables, se utilizó como blanco 200 µl de medio LB estéril diluidos en 800 µl de agua destilada. Los resultados obtenidos se utilizaron para determinar la hora en que

se sobrepasaba la etapa de crecimiento exponencial, esto nos ayudó obtener una mayor concentración de células vegetativas en los cultivos empleados para administrar la dosis diaria del tratamiento con *B. subtilis*.

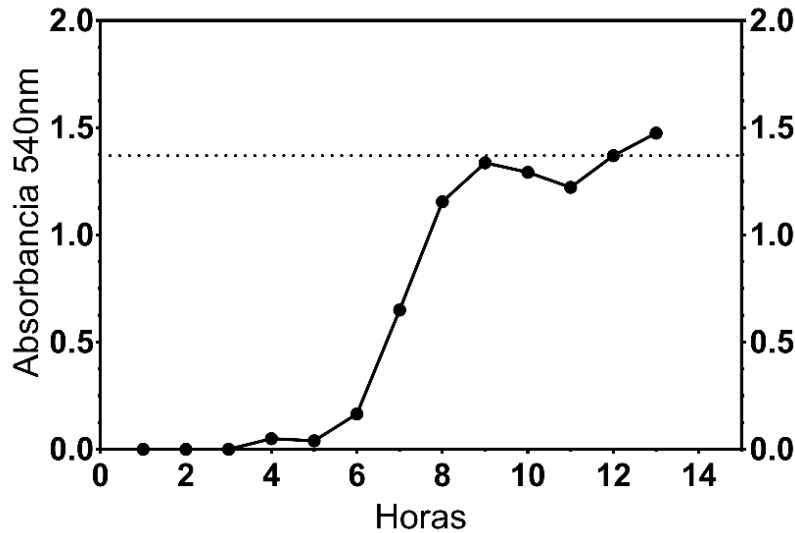


Figura 1. Curva de crecimiento de *Bacillus subtilis*.

En la Figura 1 se presenta la curva de crecimiento de *B. subtilis*. De acuerdo con el resultado de la curva de crecimiento se determinó que alícuotas similares a la empleada al inicio de la curva se cultivarían por 12 horas en la siguiente fase del trabajo. En consecuencia, se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/ml) a las 12 horas de crecimiento. Para esto fue necesario realizar al menos dos cultivos donde se inocularon 100 μ l de alícuota en 100 ml de medio LB estéril contenido en un matraz de 250ml, las condiciones de incubación fueron a 37 °C en agitación a 250 rpm. Se detuvo la incubación a las 12 horas y se tomó 1.0 ml de cultivo para realizar una dilución en serie utilizando agua peptonada (peptona 0.1%, NaCl 0.9%), la dilución se llevó hasta 1:1 x 10⁸ y se sembró por triplicado un volumen de 100 μ l de esta última dilución en cajas petri con medio sólido agar LB. Las cajas se incubaron a 37 °C toda la noche y

al día siguiente por la mañana se realizó un conteo de colonias. La concentración promedio resultó ser de 4.52×10^{10} ufc/ml del medio de cultivo con 12 hrs de incubación, y densidad óptica promedio de 1.37 a 600 nm.

8.1.1 Determinación de la viabilidad de *B. subtilis* y dosis de suplementación

Se realizaron dos ensayos preliminares para evaluar la sobrevivencia de *Bacillus subtilis* en el pH ácido del estómago. El motivo de estos ensayos es verificar que la viabilidad de las células de *B. subtilis* no se vea afectada por su exposición a los jugos gástricos del estómago ocurrida durante su tránsito hacia el intestino delgado. La viabilidad de *B. subtilis* en intestino delgado es vital para su establecimiento y manifestación de propiedades probióticas.

Los ensayos consistieron en incubar 1 ml de cultivo de *B. subtilis* (con 12 horas de incubación en medio LB a 37 °C y agitación a 250 rpm) en un volumen total de 10 ml de jugo gástrico durante 1 hora a 37 °C y agitación ligera (150 rpm). El jugo gástrico fue obtenido directamente del estómago de cerdos recién sacrificados, cuyo pH fue de 4.2 y 3.0. Antes y después de la incubación en jugo gástrico se realizó una dilución en serie para conteo de colonias en cajas Petri con medio agar LB. La concentración viable por mililitro de *B. subtilis* no fue afectada por su exposición a los pH antes mencionados.

Para determinar la dosis diaria de *B. subtilis* a administrar como probiótico a lechones destetados se utilizaron como referencia las concentraciones utilizadas en experimentos similares con cepas de *B. subtilis* (Cuadro 1, sección Marco Teórico).

Se administró una dosis diaria de 4.52×10^{11} ufc por día a cada cerdo, esta dosis es similar o superior a la administrada por otros autores. Se utilizaron dosis elevadas con la finalidad de forzar una respuesta en los animales. En

consecuencia, diariamente se sembrarían 100 µl de la alícuota en stock de *B. subtilis* en 100ml de medio LB (37 °C, 250 rpm), diariamente. Previo a la suplementación se midió la densidad óptica, asegurando que el cultivo alcanzara la absorbancia establecida de 1.37 a 600 nm, y con ello aseguró la administración de la dosis objetivo durante el período experimental.

8.2 Suplementación de *B. Subtilis* y condiciones experimentales

La suplementación con *B. subtilis* a lechones destetados se llevó a cabo en la Unidad de Fisiología y Metabolismo de Cerdos; el análisis de las muestras colectadas al sacrificio se realizó en el laboratorio de Nutrigenómica, perteneciente al Instituto de Ciencias Agrícolas de la UABC.



Figura 2. Comedero, bebedero y corral en que fueron alojados los cerdos.

Se utilizaron 14 lechones destetados híbridos Landrace x Yorkshire x Duroc con un peso promedio inicial de 9.63 ± 1.68 kg. Los lechones fueron asignados de manera aleatoria a uno de dos tratamientos: T1, tratamiento testigo; T2, cerdos suplementados con 4.52×10^{11} ufc de *B. subtilis* al día. Dos cerdos machos castrados y cinco hembras por tratamiento.

Los lechones fueron alojados individualmente en corrales de piso elevado y plastificado (1.2 m ancho, 1.2 m largo y 1.0 m alto), equipados con comedero de acero inoxidable y bebedero de chupón. El agua y alimento fueron administrados *ad libitum*. Los lechones fueron alimentados con una dieta libre de antibióticos con trigo y pasta de soya como ingredientes principales, y adicionada con aminoácidos, vitaminas y minerales, formulada para cubrir los requerimientos nutricionales de lechones de acuerdo con el NRC (2012; Cuadro 2).

Cuadro 2. Dieta experimental para cerdos 10-25kg.

Ingrediente	gr/kg
Trigo	763.1
Soya	200.0
L-Lys.HCl	5.8
L-Thr	1.5
DL-Met	1.0
Carbonato de calcio	14.1
Ortofosfato	7.0
Sal iodizada	3.5
Vit. Min. Premix	4.0
Total	1000

Los lechones tuvieron una fase de adaptación al manejo y alimentación de 10 días. La fase experimental tuvo una duración de 21 días. El peso promedio de los lechones fue de 12.93 ± 2.28 kg. La administración del probiótico se realizó en dos dosis diarias administradas a las 0700 y 1900 horas del día, en cada ocasión se ofrecieron 5 ml de medio de cultivo de *B. subtilis*, que en conjunto los 10 ml de cultivo contenían al menos 4.52×10^{11} ufc. El medio de cultivo fue administrado oralmente a los cerdos mediante una jeringa desechable de 10 ml. Los lechones del tratamiento testigo recibieron medio de cultivo estéril en la misma cantidad, forma y horario que los animales suplementados con el probiótico. Durante el período de adaptación los cerditos fueron entrenados para beber medio de cultivo estéril directamente de la jeringa, y así facilitar la administración del probiótico.

Los cerdos fueron pesados cada siete días para calcular la ganancia diaria de peso (GDP). El consumo de alimento (CDA) y la conversión alimenticia (CA) también se midieron con esa frecuencia. Diariamente, y a lo largo de todo el experimento, se registró la incidencia de diarrea.

Rutinariamente, en las mañanas se realizó la limpieza de la sala y jaulas de los cerdos, y se aseguró que el agua y alimento se encontrarán disponibles para los animales. Además, mediante un higrómetro (Thermotracker Higro) se registraron la temperatura ambiental y humedad relativa de la sala cada 15 minutos durante todo el experimento.

8.2.1 Colecta de muestras al sacrificio para análisis en laboratorio

Al terminar el período experimental se seleccionaron 8 cerdos (4 por tratamiento) para sacrificio y colecta de muestras. El sacrificio se realizó mediante inmovilización con descarga eléctrica y desangrado. Posteriormente se realizó la evisceración y se colectó el contenido de yeyuno e íleon de cada cerdo. Las muestras colectadas en tubos estériles de 50 ml fueron conservadas a -4 °C hasta el final de la colecta. Posteriormente todas las muestras se almacenaron en un congelador a -20°C. El procedimiento de la toma de muestras siempre fue menor a 15 min.

8.2.2 Extracciones de ADN de contenido intestinal y cuantificación

Las muestras de contenido intestinal obtenidas en la colecta fueron descongeladas y homogenizadas para realizar alícuotas en tubos de 1.5 ml.

Para la extracción de ADN de las muestras de contenido intestinal se utilizaron 150 µl de muestra (aparición sólida-pastosa) y se colocaron en un tubo estéril de 1.5 ml. A cada muestra se le añadió 1 ml de DNAzol (Invitrogen, California, EUA), se mezcló por inversión y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Los sólidos de la muestra se precipitaron durante el tiempo de incubación y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. A continuación, se añadieron 500 µl de etanol al 100 %, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Posteriormente se centrifugó a 4000 x g durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet fue lavado por inversión con 800 µl de etanol al 75 % e incubándolo 1 min. Luego se centrifugó a 4000 x g durante 2 minutos, al terminar se retiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet manteniendo el tubo destapado durante 5 min. Por último se resuspendió el pellet de ADN obtenido utilizando 35 µl de agua libre de nucleasas.

Las muestras de ADN obtenidas se corrieron en gel de agarosa al 1 % para comprobar su integridad. La concentración de ADN se cuantificó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Helios Beta, Massachusetts, EUA) mediante lectura de absorbancia a 260 nm (Sambrook y Russell, 2001). Los resultados de concentración se emplearon para calcular y realizar alícuotas de ADN a concentración de 50 ng/μl en volúmenes de 50 ó 100 μl según la cantidad disponible. El ADN se conservó a -20 °C hasta su uso en los ensayos de PCR cuantitativo.

8.2.3 Determinación de población microbiana en contenido intestinal

Mediante la técnica de PCR cuantitativo se analizaron los cambios relativos en la población intestinal de *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *E. coli*, *Bifidobacterium sp.* y *Clostridium sp.* Para la determinación de cada organismo, así como para bacterias totales (16S) se utilizaron los oligonucleótidos específicos presentados en el Cuadro 4.

En esta técnica se empleó el ADN genómico, previamente ajustado a 50 ng/μl. Las reacciones para PCR cuantitativo contenían 50 ng de DNA, 0.5 μM de cada oligonucleótido específico (sentido y antisentido), 12.5 μl de 2x SYBR green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), y agua libre de ADNasa/ARNasa para completar el volumen final de 25 μl en microtubos de 200 μl. Las condiciones de la PCR utilizadas para la amplificación de cada fragmento específico se presentan en el Cuadro 3. La fluorescencia de cada tubo se midió al final de cada ciclo y cada 0.5 °C durante el programa de desnaturalización. Cada muestra se analizó por duplicado, además para cada análisis de ADN se emplearon blancos sin ADN, sin SYBR Green y sin oligonucleótidos. Las reacciones de PCR cuantitativo se llevaron a cabo en un

termociclador Chromo 4 Real-Time PCR detector (Bio-Rad, California, United States) y las lecturas de fluorescencia con Opticon Monitor 3 (v3.1, Bio-Rad).

El análisis de resultados se analizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ descrito por Livak y Schmittgen (Livak y Schmittgen, 2001), los valores de C_T de cada muestra fueron corregidos con el C_T de las muestras amplificadas con el oligonucleótido de bacterias totales 16S.

Cuadro 3. Protocolo de PCR tiempo real.

Etapas	Tiempo	Temperatura (°C)	Ciclos
Desnaturalización Inicial	3 min	95	1
Desnaturalización	30 seg	95	
Alineación	30 seg	56-60	40
Elongación	1 min	72	
Lectura de plato C(t)			
Curva de desnaturalización con lectura cada 0.5°C	20 seg	65-95	60
Incubación	Indefinido	10	1

Cuadro 4. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas con cada género bacteriano para cuantificación en PCR de tiempo real.

Oligo	Secuencia	Alineación	Prod. (pb)	Referencia
<i>Bacillus sp</i>				
Sentido	ACGCCGTAAACGATGAGT	60°C	424 pb	Han <i>et al.</i> , 2012
Antisentido	GTGTGTAGCCCAGGTCATAA			
<i>Escherichia coli</i>				
Sentido	AGAAGCTTGCTCTTTGCTGA	56°C	120 pb	Lee <i>et al.</i> , 2010
Antisentido	CTTTGGTCTTGCGACGTTAT			
<i>Lactobacillus sp</i>				
Sentido	CGATGAGTGCTAGGTGTTGGA	60°C	186 pb	Fu <i>et al.</i> , 2006
Antisentido	CAAGATGTCAAGACCTGGTAAG			
<i>Bifidobacterium sp</i>				
Sentido	GATTCTGGCTCAGGATGAACG	58°C	1400 pb	Kaufmann <i>et al.</i> , 1997
Antisentido	CGGGTGCT(A/G/C/T)CCCACCTTTCATG			
Bacterias totales (16S)				
Sentido	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	56°C	466 pb	Nadkarni <i>et al.</i> , 2002
Antisentido	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT			

8.2.4 Determinación de genes antibióticos en *B. subtilis*

Con la finalidad de determinar si *B. subtilis* tendría algún efecto sobre la población de otros microorganismos se realizaron análisis de PCR de punto final para determinar la presencia de genes para la producción de antibióticos en *B. subtilis* empleado en este trabajo. Con este fin se emplearon los oligonucleótidos específicos reportados por Cao *et al.* (2012, Cuadro 5), y se analizó la presencia de genes para Subtilosina, Subtilisina, Iturina A, Fegycina FND, Bacilomycina y Surfactina en *B. subtilis*.

Las reacciones de amplificación de 50 μ l fueron preparadas en tubos individuales de 0.2 ml, y en cada reacción se colocó lo siguiente: 40.5 μ l de agua libre de nucleasas, 1 μ l dNTPs a concentración 10 μ M, 5 μ l de buffer 5X para Taq polimerasa, 1 μ l de oligonucleótido antisentido (10 μ M), 1 μ l de oligonucleótido sentido (10 μ M), 0.5 μ l de enzima Taq DNA polimerasa y 1 μ l de ADN genómico de *B. subtilis*. La extracción de ADN de *B. subtilis* se realizó de un cultivo puro de este organismo.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador T100 de Bio-Rad con un programa con gradiente de 52°C a 58°C para lograr la amplificación de cada producto con la temperatura de alineación específica de cada par de oligonucleótidos, de acuerdo con el Cuadro 5. El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial, 3 min a 94 °C; 35 ciclos de desnaturalización, 30 seg a 94 °C, alineación 45 seg 52-58 °C, extensión 1 min a 72 °C; elongación final 7 min a 72 °C; incubación final a 10 °C.

Cuadro 5. Secuencias, tamaño del producto y temperatura de alineación de los oligonucleótidos utilizados para la identificación de genes antibióticos en *B. subtilis* utilizando la técnica de PCR (Cao et al., 2012).

Oligo	Secuencia	Producto	Alineación
Subtilisin			
Sentido	CTTAAACGTCAGAGGCGGAG	704 pb	58°C
Antisentido	ATTGTGCAGCTGCTTGTACG		
Subtilosin			
Sentido	TCGGTTTGTAACCTTCAACTGC	334 pb	52°C
Antisentido	GTCCACTAGACAAGCGGCTC		
Bacillomycin			
Sentido	CTGGAAGAGATGCCGCTTAC	850 pb	52°C
Antisentido	AAGAGTGCGTTTTCTTCGGA		
Iturin ituA			
Sentido	TGCCAGACAGTATGAGGCAG	885 pb	58°C
Antisentido	CATGCCGTATCCACTGTGAC		
Fengycin fenD			
Sentido	CCTGCAGAAGGAGAAGTGAAG	293 pb	52 °C
Antisentido	TGCTCATCGTCTTCCGTTTC		
Surfactin			
Sentido	GTTCTCGCAGTCCAGCAGAAG	308 pb	58 °C
Antisentido	GCCGAGCGTATCCGTACCGAG		

8.2.5 Análisis estadístico

Los resultados de comportamiento productivo y abundancia relativa de ADN se analizaron mediante análisis de varianza y comparación de Tukey para un diseño de bloques completos al azar con el software Statistix 9.0 (Analytical Software). Los valores de $P < 0.05$ se consideraron diferentes estadísticamente y los valores de $0.05 > P < 0.10$ se consideraron tendencias.

IX. RESULTADOS

Los animales fueron sometidos a experimentación bajo condiciones termoneutrales. La humedad relativa máxima promedio fue de 77.21 % y la mínima de 48.51 % (Figura 3). La temperatura se mantuvo en un rango de confort, el promedio más alto que se obtuvo fue de 25.1 °C y el más bajo de 18.9 °C (Figura 4).

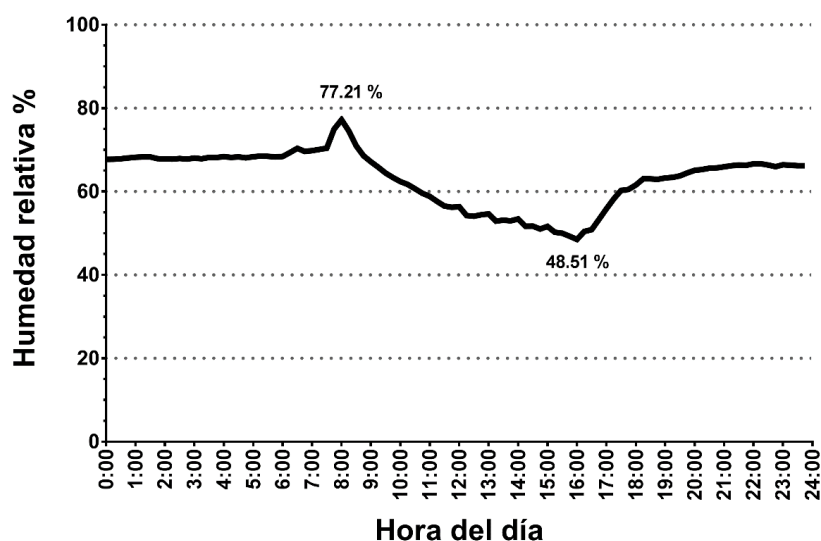


Figura 3. Variación de la humedad relativa promedio dentro de la sala en el transcurso de los días del período experimental.

La incidencia de diarreas fue similar entre tratamientos, mostrando una reducción semana tras semana de manera general (Cuadro 6). Se clasificaron como diarreas mecánicas ya que los lechones no presentaron otros signos de enfermedad (ej., fiebre, depresión, postración, etc.), identificar el tipo y frecuencia de diarrea fue indispensable para entender las condiciones a las que estuvieron expuestos los lechones. Ningún lechón murió durante el período experimental.

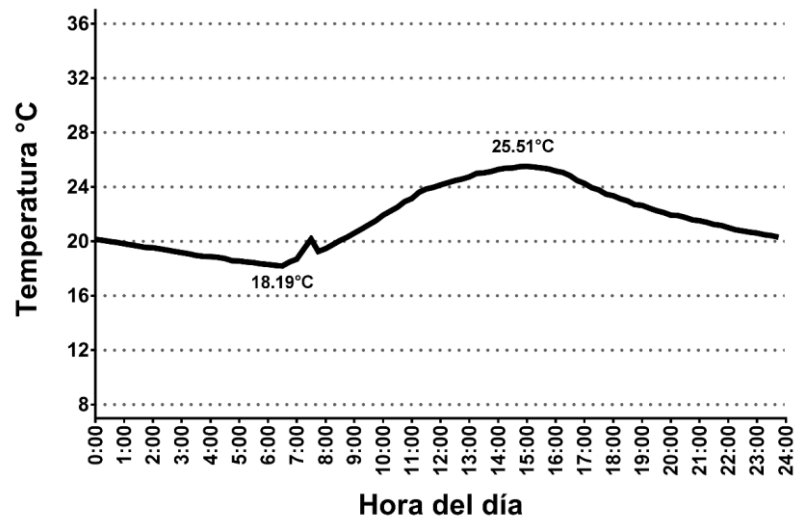


Figura 4. Variación de la temperatura promedio dentro de la sala en el transcurso de los días del período experimental.

Cuadro 6. Incidencia de diarreas durante el período experimental.

ID	Semana 1	Semana 2	Semana 3	General
T1 R1	4	0	1	
T1 R2	0	0	0	
T1 R3	1	3	4	
T1 R4	1	0	0	
T1 R5	4	2	0	
T1 R6	1	0	0	
T1 R7	1	0	0	
T1	12	5	5	22
T2 R1	1	0	0	
T2 R2	0	0	0	
T2 R3	3	1	0	
T2 R4	0	0	0	
T2 R5	2	1	0	
T2 R6	5	6	2	
T2 R7	0	1	0	
T2	11	9	2	22

No se observó diferencia en el comportamiento productivo para las variables consumo de alimento, ganancia diaria de peso y conversión alimenticia, por semana y durante todo el período experimental (Cuadro 7). Únicamente en la Semana 3 se encontró una tendencia a incrementar el consumo de alimento (100 g promedio) en los cerdos suplementados con *B. subtilis* (P = 0.06).

Cuadro 7. Comportamiento productivo de los cerdos en destete bajo condiciones termoneutrales durante el período experimental.

	Testigo	<i>B. subtilis</i>	SEM	Valor de P
Semana 1				
CDA	0.8979	0.9346	0.0510	0.4754
GDP	0.4974	0.5451	0.0604	0.5965
CA	1.8100	1.8043	0.1467	0.9789
Semana 2				
CDA	1.1334	1.1729	0.0345	0.4493
GDP	0.7061	0.7359	0.0295	0.5028
CA	1.6057	1.6414	0.0984	0.8061
Semana 3				
CDA	1.2989	1.4757	0.0552	0.0641
GDP	0.6090	0.6773	0.0426	0.3000
CA	2.1400	2.2329	0.0830	0.2175
General				
CDA	1.1077	1.1997	0.0354	0.1159
GDP	0.5770	0.6464	0.0364	0.2256
CA	1.9357	1.9071	0.0753	0.7975

CA = Conversión alimenticia. GDP= Ganancia diaria de peso. CDA= Consumo diario de alimento.

La abundancia relativa de ADN genómico de las bacterias analizadas no fue diferente entre tratamientos para las secciones analizadas (Cuadro 8), a excepción de la sección íleal donde se encontró una reducción en la abundancia de ADN de *Lactobacillus spp.* (P = 0.01; Cuadro 9 y Figura 5)

en cerdos suplementados con *B. subtilis* siendo diez veces menor respecto al tratamiento testigo. No se detectó la presencia de ADN de *E. coli* en ninguno de los tratamientos ni en ninguna de las secciones analizadas.

Cuadro 8. Promedio del ΔC_T de amplificación de ADN para cada género de microorganismos en sección yeyuno.

Género	Tratamiento	Media ΔC_T	SEM	Valor de P
<i>Bacillus</i>	T1	0.2225	0.5891	0.4252
	T2	0.9350		
<i>Bifidobacterium</i>	T1	8.3000	0.6547	0.7511
	T2	7.9925		
<i>Lactobacillus</i>	T1	5.8125	0.6703	0.1231
	T2	7.5125		

T1 = Dieta estándar sin *B. subtilis*. T2= Dieta estándar con *B. subtilis* 4.5x10¹¹ UFC al día

Cuadro 9. Promedio del ΔC_T de amplificación de ADN para cada género de microorganismos en sección íleon.

Género	Tratamiento	Media ΔC_T	SEM	Valor de P
<i>Bacillus</i>	T1	1.1800	0.3920	0.7564
	T2	1.3600		
<i>Bifidobacterium</i>	T1	12.305	1.2126	0.7511
	T2	12.677		
<i>Lactobacillus</i>	T1	4.3275	0.6632	0.0100
	T2	7.8050		

T1 = Dieta estándar sin *B. subtilis*. T2= Dieta estándar con *B. subtilis* 4.5x10¹¹ UFC al día

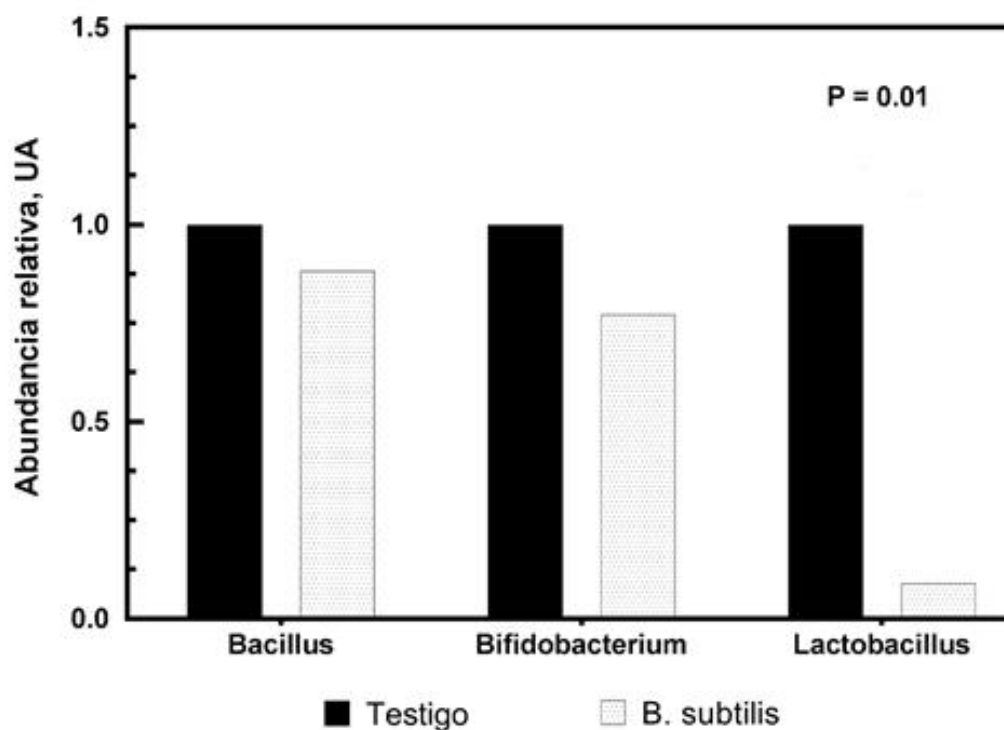


Figura 5. Abundancia relativa de ADN de los microorganismos detectados en sección íleon de los cerdos alimentados con dieta estándar o dieta estándar suplementada con *B. subtilis*.

Mediante reacciones de PCR para detección de antibióticos y bacitracinas en la cepa utilizada permitieron detectar la presencia de genes codificantes para Subtilosina, Subtilisina, Iturina A y Bacilomycina (Figura 7). Con el oligonucleótido para Bacilomycina se obtuvieron dos productos, uno correspondiente a las 850 pb que nos indica la literatura (Cao *et al.*, 2012) y otro de mayor tamaño (entre 1100 y 1200 pb) del cual se desconoce su homología con el gen de Bacilomycin. El oligonucleótido utilizado para la detección del gen codificante para Surfactina generó dos productos pero ninguno de ellos correspondía al tamaño reportado en la literatura por lo que para identificar estos fragmentos sería necesario recuperar el producto obtenido y realizar una secuenciación de ADN.

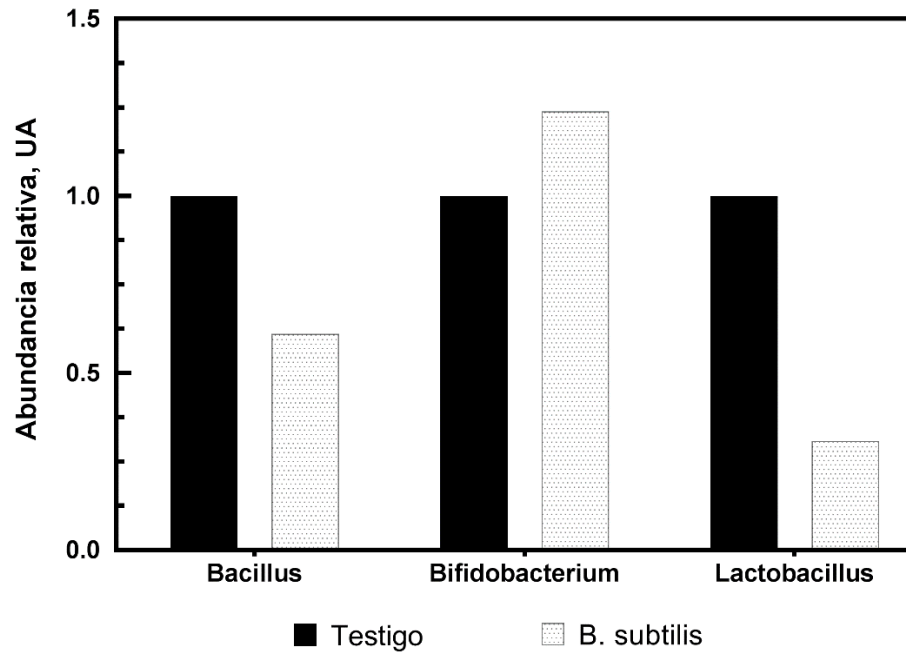


Figura 6. Abundancia relativa de ADN de los microorganismos detectados en sección yeyuno de los cerdos alimentados con dieta estándar o dieta estándar suplementada con *B. subtilis*.

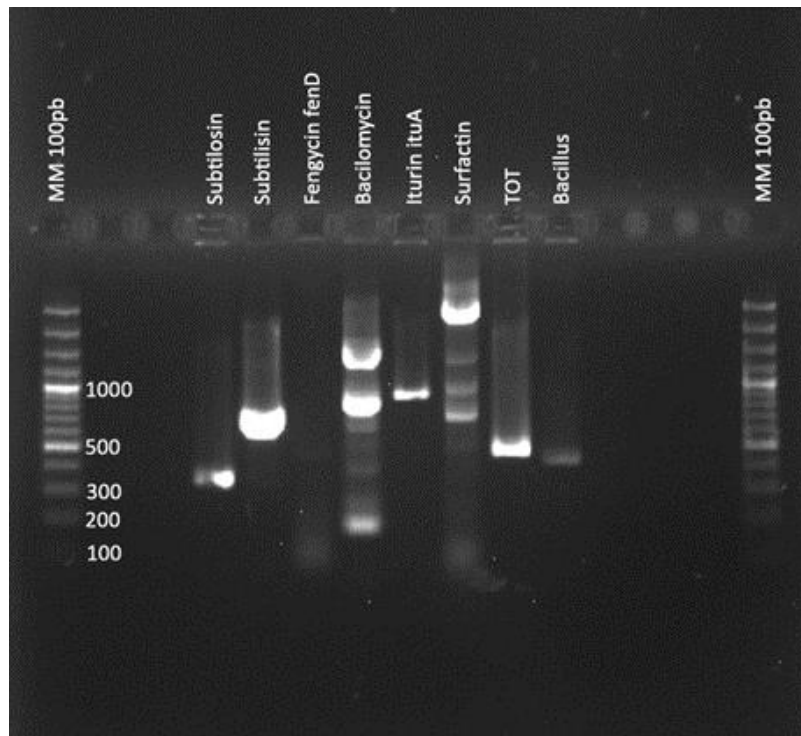


Figura 7. Fragmentos amplificados del PCR Punto Final utilizando oligonucleótidos para la detección de genes antibióticos en una muestra de ADN perteneciente a *Bacillus subtilis*.

X. DISCUSIÓN

El problema más común durante el destete, la diarrea (Heo *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2014; Rhouma *et al.*, 2017), puede presentarse a causa de cambios en la dieta como el aumento en el nivel de proteína, fibra, estrés, etc. En esta situación el crecimiento del animal continúa aún con la incidencia de diarrea o heces sueltas (Lawhorn, 1999). En este experimento la presencia de diarreas no anuló la ganancia de peso y no ocasionó mortalidad ni manifestó síntomas de enfermedad por infección aun cuando presentaron evacuaciones líquido-pastosas, por lo que podríamos especular que la diarrea presentada fue solo mecánica.

Varios trabajos han demostrado mejoras en el comportamiento productivo al suplementar la dieta con *B. subtilis* bajo condiciones similares a las de este experimento (Alexopoulos *et al.*, 2004a; Guo *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2013; Yuangliang *et al.*, 2014). Sin embargo no se observó diferencia para ninguno de las variables productivas evaluadas, lo cual concuerda con lo publicado en otros experimentos donde se suplementó la dieta con *Bacillus sp.* utilizando dosis menores (Kritas y Morrison, 2005; Giang *et al.*, 2012; Sheng *et al.*, 2015) o mayores (Nitikanjana *et al.*, 2011). Tal hecho apoya la hipótesis de que las funciones probióticas de los microorganismos podrían ser específicas de la cepa utilizada (Newbold *et al.*, 1995; Weichelbaum, 2009). Fuller (1986) menciona que concentraciones inadecuadas en la suplementación con microorganismos puede ocasionar resultados no satisfactorios o incluso negativos.

La tendencia que se observó sobre un mayor consumo de alimento durante la tercer semana para el tratamiento con *B. subtilis* coincide con los resultados obtenidos por Prieto *et al.* (2014), quienes observaron una tendencia ($P=0.07$) a incrementar el consumo de alimento durante la tercera semana de suplementar con otra especie de *Bacillus spp.* Esta tendencia también apoya la hipótesis de que los efectos por la suplementación con probióticos en la

dieta empiezan a ser reflejados semanas después de iniciarse o llevarse a cabo su aplicación (Deng *et al.* 2013) donde los efectos benéficos de suplementar con probiótico durante la primera semana de nacimiento se reflejan hasta una semana después de ocurrir el destete. Se ha observado que el suplementar a cerdas en gestación y/o lactancia con probiótico mejora el crecimiento de los lechones al destete (Alexopoulos *et al.*, 2004b; Baker *et al.*, 2013). Lo anterior indica que podrían ser necesarios períodos más largos de experimentación para encontrar o descartar la función probiótica que pudiese brindar el microorganismo utilizado como suplemento.

Se ha demostrado que *Bacillus subtilis* es capaz de colonizar y esporular dentro del tracto gastrointestinal de cerdos al menos de manera temporal (Casula y Cutting, 2002; Leser *et al.*, 2008). La influencia que *Bacillus spp.* se ha demostrado sobre otras poblaciones de microorganismos dentro del tracto gastrointestinal (Maruta *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014), y sugiere su capacidad para establecer relaciones simbióticas, lo cual se observó cuando se suplementó en combinación con *Bacillus spp.* y *Lactobacillus spp.* (Hosoi *et al.*, 2000; Alexopoulos *et al.*, 2004a). Sin embargo en este trabajo no se encontró diferencias en la abundancia relativa de ADN correspondiente a *Bacillus spp.* entre tratamientos, lo cual cuestiona, parcialmente, la capacidad de nuestra cepa para colonizar en intestino delgado.

Otros autores han observado que la población de *Lactobacillus spp.* es afectada durante la transición del destete (Jensen, 1998; Inoue *et al.*, 2005). En nuestro trabajo no fue posible saber si la población de *Lactobacillus spp.* disminuyó al iniciar el destete puesto que no se realizó un muestreo previo al inicio de esta etapa con el que se pueda comparar la abundancia relativa de ADN correspondiente a este género; sin embargo de haber ocurrido o no esta disminución en la población, la suplementación disminuyó la abundancia de *Lactobacillus spp.* a una décima parte de la observada en íleon de los animales

en el tratamiento testigo. Este resultado es contrario al observado por Guo *et al.* (2006) quienes observaron que la suplementación con *B. subtilis* (2.2×10^5 ufc/gr de alimento) incrementó la población de *Lactobacillus spp.* en heces. A pesar de la significativa reducción en la población de *Lactobacillus spp.*, lo cual no produjo un efecto negativo en el comportamiento productivo de los cerdos.

Maruta *et al.*, (1996) reportaron que al suplementar *B. subtilis* a cerdas gestantes la población de *Bifidobacterium spp.* en heces se incrementó. En el presente trabajo no se detectó efecto alguno sobre este género para ninguna de las secciones analizadas en intestino delgado.

La bacteria *E. coli* es considerada un habitante normal del tracto gastrointestinal (Jensen *et al.*, 2001) tanto en cerdos sanos como enfermos (Schierack *et al.*, 2006). Sin embargo no se reportó su presencia para las secciones de intestino delgado analizadas, yeyuno e íleon.

Los microorganismos utilizados como probiótico deben sobrevivir en su tránsito por el tracto gastrointestinal superior previo a su llegada al intestino delgado (Huang y Adams 2004). En este trabajo se realizaron ensayos *in vitro* simulando las condiciones de temperatura y pH (3.0) del estómago y se verificó la sobrevivencia de *B. subtilis*. Sin embargo, otros factores como enzimas, condiciones ambientales propias del intestino, o el tiempo para llegar a intestino delgado podrían haber afectado la viabilidad del microorganismo. Por lo anterior, se sugiere que podrían llevarse a cabo más estudios al respecto.

Las poblaciones de microorganismos que componen a la microbiota intestinal compiten entre sí al fijarse en sitios receptores del epitelio intestinal (La Ragione *et al.*, 2004; Suardi *et al.*, 2013). Esto abre la posibilidad de hacer uso del moco obtenido al realizar raspados de mucosa intestinal para el análisis de la población bacteriana en la microbiota en vez de utilizar contenido intestinal.

La producción de compuestos antimicrobianos por parte de organismos probióticos ha sido mencionado como uno de sus mecanismos de acción para combatir a otros microorganismos, algunos patógenos, que compiten con la población benéfica de la microbiota intestinal (Buts, 2004; Urdaci et al., 2004; Suardi *et al.*, 2013; Dubreuil, 2017). Este podría ser uno de los criterios importantes al momento de elegir una cepa probiótica (Chang et al., 2001; Dunne et al., 2001; Hong et al., 2005). Algunas cepas de *Bacillus spp.* disponibles en productos comerciales tienen la habilidad de producir compuestos antimicrobianos como aminocumaim A (Pinchuk et al., 2001) y bacteriocina (Zheng y Slavik 1999; Cladera-Olivera et al., 2004). La detección de genes codificantes para compuestos antimicrobianos en la cepa de *B. subtilis* utilizada en este experimento, confirma la capacidad de esta cepa para sintetizar subtilosina, subtilisina, iturina A y bacilomicina. Sin embargo este resultado no garantiza su expresión y efecto durante el ensayo *in vivo* (Urdaci *et al.*, 2004), por lo que deberían llevarse a cabo estudios específicos que confirmen mediante secuenciación de ADN la presencia y expresión de RNAm y proteína de estos genes, tanto a nivel de laboratorio como en estudios *in vivo* en donde se evalúe su efecto sobre otros microorganismos presentes en intestino delgado.

XI. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos no sustentan la hipótesis de que suplementar con *B. subtilis* tenga un efecto probiótico en cerdos destetados. Sin embargo, tampoco alteró ninguna de las variables de comportamiento productivo, aunque debido a que redujo la población de *Lactobacillus*, es posible que afecte la abundancia de otros microorganismos.

Sería conveniente realizar el experimento a un período experimental mayor con el objetivo de dar más tiempo a la cepa para determinar su efecto sobre las variables de interés zootécnico. Iniciar la suplementación en la etapa de lechón también puede ser una opción ya que sería más fácil para *B. subtilis* establecerse dentro del tracto gastrointestinal.

XII. LITERATURA CITADA

- Abriouel, H., Franz, C.M., Ben, O.N., Galvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. *FEMS Microbiology Reviews*, 35:201–232.
- Alexopoulos, C., Georgoulakis, I.E., Tzivara, A., Kyriakis, C.S., Govaris, A., Kyriakis, S.C. (2004a). Field evaluation of the effect of a probiotic-containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores on the health status, performance, and carcass quality of grower and finisher pigs. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, 51(6), 306–312.
- Alexopoulos, C., Georgoulakis, I.E., Tzivara, A., Kritas, S.K., Siochu, A., Kyriakis, S.C., (2004b). Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 88, 381–392.
- Allen, H.K., Levine, U.Y., Looft, T., Bandrick, M., Casey, T.A. (2013). Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends Microbiology*, 21:114–9.
- Amezcuca, R., Friendship, R.M., Dewey, C.E., Gyles, C., Fairbrother, J.M. (2002). Presentation of postweaning *Escherichia coli* diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic *E. coli* serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66:73–78.
- Anadon, A., Martinez-Larranaga, M.R., Aranzazu-Martinez, M. (2006). Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and

- safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45:91–95.
- Andoh, A., Fujiyama, Y., (2006). Therapeutic approaches targeting intestinal microflora in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 12:4452–4460.
- Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915–1920.
- Bailey, M. (2009). The mucosal immune system: recent developments and future directions in the pig. *Dev Comp Immunol* 33: 375–383.
- Bailey, M., Haverson, K., Inman, C., Harris, C., Jones, P., Corfield, G., Miller, B., Stokes, C. (2005). The development of the mucosal immune system pre- and postweaning: balancing regulatory and effector function. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64: 451–457.
- Bauer, E., Williams, B.A., Smidt, H., Mosenthin, R., Verstegen, M.W.A. (2006). Influence of dietary components on development of the microbiota in single-stomached species. *Nutrition Research Reviews* 19, 1–17.
- Benítez, W., Sánchez, M. (2000). “Aspectos generales de la producción porcina tradicional”. FAO, 2000.
- Bhandari, S.K., Xu, B., Nyachoti, C.M., Giesting, D.W., Krause, D.O., (2008). Evaluation of alternatives to antibiotics using an *Escherichia coli* K88+ model of piglet diarrhoea: effects on gut microbial ecology. *Journal of Animal Science* 86, 836–847.
- Borriss, R., Chen, X.H., Rueckert, C., Blom, J., Becker, A., Baumgarth, B., Fan, B., Pukall, R., Schumann, P., Sproer, C., Junge, H., Vater, J., Puhler, A., Klenk, H.P. (2011). Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7 T and FZB42T: a proposal for

Bacillus amyloliquefaciens subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61:1786–1801.

Buts, J.P., (2004). Exemple d'un médicament probiotique: *Saccharomyces boulardii* lyophilisé. In: Rambaud, J.C., Buts, J.P., Corthier, G. and Flourié, B. (eds.) *Flore microbienne intestinale*. John Libbey Eurotext, Montrouge, France, pp. 221-244.

Caldini, G., Trotta, F. and Cenci, G. (2002). Inhibition of 4- nitroquinoline-1-oxide genotoxicity by *Bacillus* strains. *Research Microbiology* 153, 165–171.

Campbell, J.M., Crenshaw, J.D., Polo, J. (2013). The biological stress of early weaned piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2013, 4:19

Cao Y., Xu Z., Ling N, Yuan Y., Yang X., Chen L., Shen B., Shen Q. (2012). Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. *Scientia Horticulturae* 135: 32–39.

Carroll, J.A., Veum, T.L., Matteri, R.L. (1998). Endocrine responses to weaning and changes in post-weaning diet in the young pig. *Domestic Animal Endocrinology*, 15:183–98.

Casula, G., Cutting, S.M. (2002). *Bacillus* probiotics: Spore Germination in the Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 68, No. 5 p. 2344-2352.

Chang, Y.H., Kim, J.K., Kim, H.J., Kim, W.Y., Kim, Y.B., Park, Y.H. (2001). Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent in vivo studies. *Antonie Van Leeuwenhoek* 80:193–199

- Chaucheyras-Durand, F., Durand, H. (2010). Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes* 1: 3–9.
- Chen, Y.J., Min, B.J., Cho, J.H., Kwon, O.S., Kim, I.H. (2005). Effects of Dietary Probiotic on Growth Performance, Nutrients Digestibility, Blood Characteristics and Fecal Noxious Gas Content in Growing Pigs. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, 406–411.
- Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L. (2014). Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? *Frontiers in Microbiology*. 5:217.
- Choct, M. (2009). Managing gut health through nutrition. *British Poultry Science*, 50: 9-15.
- Cladera-Olivera, F., Caron, G.R., Brandelli, A. (2004). Bacteriocin like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Letters in Applied Microbiology*, 38:251–256.
- CMC. Consejo Mexicano de la Carne. (2016). Compendio estadístico 2016. (<http://infocarne.comecarne.org/compendio>)
- Cross, M.L. (2002). Microbes versus microbes: immune signals generated by pro-biotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 34, 245–253.
- Cui, C., Shen, C.J., Jia, G., Wang, K.N. (2013). Effect of dietary *Bacillus subtilis* on proportion of Bacteroidetes and Firmicutes in swine intestine and lipid metabolism. *Genetics and Molecular Research*, 12(2), 1766–1776.
- Cutting, S.M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology* 28:214-220.

- Dantzer, R., Mormède, P. (1981). Influence du mode d'élevage sur le comportement et l'activité hypophysocorticosurrénaïenne du porcelet. *Reproduction Nutrition Development*, 21:661–70.
- Daudelin, J.F., Lessard, M., Beaudoin, F., Nadeau, E., Bissonnette, N., Boutin, Y. (2011). Administration of probiotics influences F4 (K88)-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* attachment and intestinal cytokine expression in weaned pigs. *Veterinary Research*, 42: 69-80.
- Davis, M.E., Parrott, T., Brown, D.C., De Rodas, B.C., Johnson, Z.B., Maxwell, C.D., Rehberger, T. (2008). Effect of a *Bacillus* based direct-fed microbial feed supplement on growth performance and pen cleaning characteristics of growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 86:1459–1467.
- De Lange, C.F.M., Pluske, J., Gong, J. (2010). Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. *Livestock Science*, 134: 124-134.
- De Cupere, F., Deprez, P., Demeulenaere, D., Muylle, E. (1992). Evaluation of the effect of 3 probiotics on experimental *Escherichia coli* enterotoxaemia in weaned piglets. *Zentralbl Veterinarimed B*. 39:277–284.
- Delcenserie, V., Martel, D., Lamoureux, M., Amiot, J., Boutin, Y., Roy, D., (2008). Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Current Issues in Molecular Biology* 10: 37-54.
- Deng, J., Li, Y., Zhang, J., Yang, Q. (2013). Co-administration of *Bacillus subtilis* RJGP16 and *Lactobacillus salivarius* B1 strongly enhances the intestinal mucosal immunity of piglets. *Research in Veterinary Science*, 94(1), 62–68.

- DIEES. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. (2016). Panorama agroalimentario Carne de cerdo 2016. (https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200634/Panorama_Agroalimentario_Carne_de_Cerdo_2016.pdf)
- Dividich, J.L., Seve, B. (2000). Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments in the piglet. *Domestic Animal Endocrinology* 19:63–74.
- Dubreuil, J.D. (2017). Enterotoxigenic *Escherichia coli* and probiotics in swine: what the bleep do we know? *Bioscience of Microbiota, Food and Health* Vol. 36 (3), 75–90.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73:386S–392S
- Efird, R.C., Armstrong, W.D., Herman, D.L. (1982). The development of digestive capacity in young pigs: effects of age and weaning system. *Journal of Animal Science* 55, 1380–1387.
- Fairbrother, J.M., Nadeau, E., Gyles, C.L. (2005). *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews*, 6:17–39.
- FAO/WHO Joint FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) (2012). Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. 1- 11.

- Ferencik, M., Mikes, Z., Seman, M., Ebringer, I. (2000). Beneficial modification of the human intestinal microflora using orally administered enterococci. Proceedings of International Probiotic Conference on 'The Prospects of Probiotics in Prevention and Therapy of Diseases of Young'. High Tatras, Slovak Republic, October 11 to 14, 2000. p 46.
- Fox, S.M. (1988). Probiotics: Intestinal inoculants for production animals. *Veterinary Medicine* 83, 806–830.
- Fu, C.J., Carter, J.N., Li, Y., Proter, J.H. and Kerley, M.S. (2006). Comparison of agar plate and real-time PCR on enumeration of *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* and total anaerobic bacteria in dog faeces. *Letters of Applied Microbiology* 42, 490–494.
- Fuller, R. (1986). Probiotics. Society for Applied Bacteriology Symposium Series, 15:1S–7S.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365-368.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141: S15–S28.
- Galef, B. G. (1981). The ecology of weaning: parasitism and the achievement of independence by altricial mammals. In: *Parental Care in Mammals* (Ed. by D. J. Gubernick & P. H. Klopfer), pp. 211-241. New York: Plenum Press.
- Gareau, M.G., Wine, E., Sherman, P.M., (2009). Early life stress induces both acute and chronic colonic barrier dysfunction. *NeoReviews* 10, 191–197.
- Giang, H.H., Viet, T.Q., Ogle, B., Lindberg, J.E. (2012). Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a

diet supplemented with a complex of lactic acid bacteria alone or in combination with *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces boulardii*. *Livestock Science*, 143:132–141.

Gibbs, A.L. (1972). Growth promotion in pigs. *New Zealand Veterinary Journal*, 20:4, 55-55.

Guo, X., Li, D., Lu, W., Piao, X., Chen, X. (2006). Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 90(2), 139–146.

Hampson, D.J. (1994). Postweaning *Escherichia coli* Diarrhoea in Pigs. In *Escherichia coli in domestic animals and humans* Edited by: Gyles CL. Wallingford, UK: CAB International; 171-191.

Hampson, D.J. (1986). Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Research of Veterinary Science* 40: 32–40.

Han, G.Q., Xiang, Z.T., Yu, B., Chen, D.W., Qi, H.W., Mao, X.B., Chen, H., Mao, Q., Huang, Z.Q. (2012). Effects of different starch sources on *Bacillus* spp. in intestinal tract and expression of intestinal development related genes of weanling piglets. *Molecular Biology Reports*, 39(2):1869-76.

Haoe, W.L., Lee, Y.K. (2004). Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods in Molecular Biology* 268, 491–502.

Hayes, D.J., Jensen, H.H., Fabiosa, J. (2002). Technology choice and the economic effects of a ban on the use of antimicrobial feed additives in swine rations. *Food Control* 13, 97–101.

Heo, J., Opapeju, F., Pluske, J., Kim, J., Hampson, D., Nyachoti, C. (2013). *Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding*

strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97:207–37.

Hong, H.A., Duc, L.H., Cutting, S.M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews* 29:813–835.

Hooper, L.V., Midtvedt, T., Gordon, J.I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition* 22, 283–307.

Hosoi, T., Ametani, A., Kiuchi, K., Kaminogawa, S. (2000). Improved growth and viability of lactobacilli in the presence of *Bacillus subtilis* (natto), catalase, or subtilisin. *Canadian Journal of Microbiology*, 46:892-897.

Hu, Y., Dun, Y., Li, S., Zhao, S., Peng, N., Liang, Y. (2014). Effects of *Bacillus subtilis* KN-42 on Growth Performance, Diarrhea and Faecal Bacterial Flora of Weaned Piglets. *Asian Australas. Journal of Animal Science* Vol. 27, No. 8: 1131-1140.

Huang, Y., Adams, M.C. (2004). In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 91:253–260

Inoue, R., Tsukahara, T., Nakanishi, N., Ushida, K. (2005). Development of the intestinal microbiota in the piglet. *Journal of General and Applied Microbiology* 51, 257–265.

International Human Genome Sequencing Consortium. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431: 931–945

Isaacson, R., Bum, H.K. (2012). The intestinal microbiome of the pig. *Animal Health Research Reviews* 13(1); 100–109.

- Janczyk, P., Pieper, R., Smidt, H., Souffrant, W.B. (2007). Changes in the diversity of pig ileal lactobacilli around weaning determined by means of 16S rRNA gene amplification and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Ecology* 61: 132–140.
- Jensen, A.R., Elnif, J., Burrin, D.G., Sangild, P.T. (2001). Development of intestinal immunoglobulin absorption and enzyme activities in neonatal pigs is diet dependent. *Journal of Nutrition* 131, 3259–3265.
- Jensen, B.B. (1998). The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences* 7, 45–64.
- Kabore, D., Thorsen, L., Nielsen, D.S., Berner, T.S., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., Dicko, M.H., Jakobsen, M. (2012). Bacteriocin formation by dominant aerobic sporeformers isolated from traditional maari. *International Journal of Food Microbiology*, 154:10–18.
- Kanitz, E.G., Manteuffel, G., Otten, W. (1996). Effects of weaning and restraint stress on glucocorticoid receptor binding capacity in limbic areas of domestic pigs. *Brain Research*, 804:311–15.
- Kaufman, P., Pfeffernkorn, A., Teuber, M., Meile, L. (1997). Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus64 specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Applied Environmental Microbiology* 63, 1268-1273.
- Kelly, D., Smyth, J.A., McCracken, K.J. (1991). Digestive development of the early-weaned pig. 1. Effect of continuous nutrient supply on the development of the digestive tract and on changes in digestive enzyme activity during the first week post-weaning. *British Journal of Nutrition* 65: 169–180.
- Kenny, M., Smidt, H., Mengheri, E., Miller, B. (2011). Probiotics—do they have a role in the pig industry? *Animal* 5:462–470.

- Khajareern, S., Khajareern, J. (1994). Effects of a probiotic (toyocerin) in sow and creep feeds on resistance of diarrhoea in piglets. Proceedings of the 13th International Pig Veterinary Society Congress. Bangkok, Thailand, June 26 to 30, 1994. p 294.
- Kong, X.F., Yin, F.G., He, Q.H. (2009). *Acanthopanax senticosus* extract as a dietary additive enhances the apparent ileal digestibility of amino acid in weaned piglets. *Livestock Science*, 123: 261-267.
- Kritas, S.K., Morrison, R.B. (2005) Evaluation of probiotics as a substitute for antibiotics in a large pig nursery. *Veterinary Record* 156, 447–448.
- Kyriakis, S.C., Tsiloyiannis, V.K., Vlemmas, J., Sarris, K., Tsinas, A.C., Alexopoulos, C., Jansegers, L. (1999). The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. *Research in Veterinary Science* 67, 223-228.
- La Ragione, R.M., Narbad, A., Gasson, M.J., Woodward, M.J. (2004). In vivo characterization of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. *Letters in Applied Microbiology* 38: 197-205.
- Laine, T.M., Lytikainen, T., Yliaho, M., Anttila, M. (2008). Risk factors for post-weaning diarrhea on piglet producing farms in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2008, 50:21.
- Lallès, J-P., Boudry, G., Favier, C., Le Floc'h, N., Luron, I., Montagne, L. (2004). Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Animal Research*, 53:301–16.
- Lawhorn, B. (1999) Diarrheal Disease in Show Swine. Texas Agricultural Extension Service. L-5320 7-99.

- Lee, D.H., Bae, J.E., Lee, J.H., Shin, J.S., Kim, I.S. (2010). Quantitative detection of residual *E. coli* host cell DNA by real-time PCR. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(10):1463-70.
- Le Jeune, J.T., Kauffman, M.D., Amstutz, M.D. (2006). Limited effects of a commercial direct-fed microbial on weaning pig performance and gastrointestinal microbiology. *Journal of Swine Health and Production*, 14(5):247–252.
- Leser, T.D., Knarrebord, A., Worm, J. (2008). Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus lincheformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. *Journal of Applied Microbiology*, 104:1025-1033.
- Lessard, M., Dupuis, M., Gagnon, N., Nadeau, E., Matte, J.J., Goulet, J., Fairbrother, J.M. (2009). Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. *Journal of Animal Science*, 87: 922– 934.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2^{-2ΔΔCT} Method. *METHODS* 25, 402–408.
- Luckey, T.D. (1972). Introduction to intestinal microecology. *American Journal of Clinical Nutrition* 25: 1292–1294.
- Lusk, J.L., Norwood, F.B., Pruitt, J.R. (2006). Consumer demand for a ban on antibiotic drug use in pork production. *American Journal of Agricultural Economics* 88, 1015–1033.
- Macfarlane, S., Macfarlane, G.T. (2004). Bacterial diversity in the human gut. *Advances in Applied Microbiology* 54, 261–289.

- Madec, F., Bridoux, N., Bounaix, S., Cariolet, R., Duval-Iflah, Y., Hampson, D.J. (2000). Experimental models of porcine post-weaning colibacillosis and their relationship to post-weaning diarrhea and digestive disorders as encountered in the field. *Veterinary Microbiology*, 72:295-310.
- Madec, F., Bridoux, N., Bounaix, S., Jestin, A. (1998). Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*, 35:53–72.
- Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., Doyle, J., Jewell, L., De Simone C. (2001). Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 121, 580–591.
- Manners, M.J. (1976). The development of digestive function in the pig. *Proceedings of the Nutrition Society* 35, 49–55.
- Martin, M.J., Thottathil, S.E., Newman, T.B. (2015). Antibiotics overuse in animal agriculture: a call to action for health care providers. *American Journal of Public Health*, 105:2409-2410.
- Maruta, K., Miyazaki, H., Tadano, Y., Masuda, S., Suzuki, A., Takahashi, H., Takahashi, M. (1996). Effects of *Bacillus subtilis* C-3102 Intake on Fecal Flora of Sows and on Diarrhea and Mortality Rate of their Piglets. *Animal Science and Technology (Jpn.)*, 67(5), 403–409.
- Mazza, P. (1994). The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. *Bolletino Chimico Farmaceutico* 133, 3–18.
- McCracken, B.A., Spurlock, M.E., Roos, M.A., Zuckermann, F.A., Gaskins, H.R. (1999). Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *Journal of Nutrition*, 129:613–9.

- Miller, B.G., Newby, T.J., Stokes, C.R., Bourne, F.J. (1984). Influence of diet on postweaning malabsorption and diarrhoea in the pig. *Research Veterinary Science*, 36: 187–193.
- Mroz, Z., Dekker, R.A., Koopmans, S.J., Le Huërou-Luron, I. (2003). Performance, functional features of the digestive tract and haematological indices in weaned piglets fed antibioticfree diets and exposed to a viro-bacterial infection, in: Ball R.O. (Ed.), *Proceedings of the 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*, Banff, AB, Canada, 2003, pp. 180–182.
- Murphy, W.J., Larkin, D.M., van der Wind, A.E., Bourque, G., Tesler, G., Auvil, L., Beever, J.E., Chowdhary, B.P., Galibert, F., Gatzke, L., Hitte, C., Meyers, S.N., Milan, D., Ostrander, E.A., Pape, G., Parker, H.G., Raudsepp, T., Rogatcheva, M.B., Schook, L.B., Skow, L.C., Welge, M., Womack, J.E., O'brien, S.J., Pevzner, P.A., Lewin, H.A. (2009). Dynamics of mammalian chromosome evolution inferred from multispecies comparative maps. *Science* 309, 613–618.
- Nadkarni, M.A., Martin, F.E., Jacques, N.A., Hunter, N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad range (universal) probe and primers set. *Microbiology-SGM* 148, 257–266.
- Nanthakumar, N.N., Dai, D.W., Newburg, D.S., Walker, W.A. (2003). The role of indigenous microflora in the development of murine intestinal fucosyl- and sialyltransferases. *FASEB Journal* 17, 44–46.
- Ng, S.C., Hart, A.L., Kamm, M.A. (2009). Mechanisms of action of probiotics: Recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15: 300-310.
- Nitikanchana, S., Tokach, M.D., DeRouchey, J.M., Goodband, R.D. (2011). The effect of *Bacillus* probiotic on growth performance and fecal consistency of growing-finishing pigs. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Report Vol. 0 Issue 10 Swine Day*

- Novak, K.N., Davis, E., Wehnes, C.A., Shields, D.R., Coalson, J.A., Smith, A.H., Rehberger, T.G. (2012). Effect of supplementation with an electrolyte containing a Bacillus-based direct-fed microbial on immune development in dairy calves. *Research of Veterinary Science*, 92:427-434.
- NRC. (2012). National Research Council. *Nutrient Requirements of Swine*. 12th ed. Nat. Acad. Press, Washington, DC. 400.
- O’Sullivan, G. C., Kelly, P., O’Halloran, S., Collins, C., Collins, J. K., Dunne, C., Shanahan, F. (2005). Probiotics: an emerging therapy. *Current Pharmaceutical Design* 11, 3–10.
- Ochetim S., Odur I.D. (1978) Response of young pigs to flavomycin. *East African Agricultural and Forestry Journal*, 44 (I) 31-33.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2012). Índice de Precios de los Alimentos de FAO – Mayo 2012. (www.fao.org/worldfoodsituation).
- Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek – International Journal of General and Molecular Microbiology* 82, 279–289.
- Ozawa, K., Yokota, H., Kimura, M., Mitsuoka, T. (1981). Effects of Administration of *Bacillus subtilis* strain BN on Intestinal Flora of Weanling Piglets. *Journal of the Japanese Society of Veterinary Science*, 48:771-775.
- Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale C., Preston, R., Waddell, J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53: 28–52.

- Pinchuk, I.V., Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B., Sorokulova, I.B., Megraud, F., Urdaci, M.C. (2001). In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45:3156–3161.
- Priest, F.G. (1977). Extracellular enzymesynthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriology Reviews* 41, 711–753.
- Prieto, M.L., O’Sullivan, L., Tan, S.P., McLoughlin, P., Hughes, H. (2014) Evaluation of the Efficacy and Safety of a Marine-Derived *Bacillus* Strain for Use as an In-Feed Probiotic for Newly Weaned Pigs. *PLOS ONE* 9(2): e88599.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J; MetaHIT Consortium, Bork, P., Ehrlich, S.D., Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59–65.
- Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H.G.H., Tims, S., Zoetendal, E.G., de Vos, W.M. (2012). Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition. *Environmental Microbiology*, 15: 1146–1159.
- Rhouma, M., Morris, J., Beaudry, F., Letellier, A. (2017). Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Veterinaria Scandinavica*, December 59:31.

- Riise, T. (1981). The Probiotic Concept – A Review. Chr. Hansen's Laboratorium A/S, Copenhagen, Denmark.
- Roselli, M., Finamore, A., Britti, M.S., Konstantinov, S.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Mengheri, E. (2007). The novel porcine *Lactobacillus sobrius* strain protects intestinal cells from enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection and prevents membrane barrier damage. *Journal of Nutrition* 137, 2709–2716.
- Roselli, M., Finamore, A., Britti, M.S., Mengheri, E. (2006). Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *British Journal of Nutrition*, 95: 1177–1184.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2006). Storage of Bacterial Cultures Growing in Liquid Media. *Cold Spring Harbor Protocols*.
- Sanders, M.E., Morelli, L., Tompkins, T.A. (2003). Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2, 101–110.
- Savage, D.C. (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Reviews in Microbiology* 31: 107–133.
- Sheng, Q.K., Zhou, K.F., Hu, H.M., Zhao, H.B., Zhang, Y., Ying, W. (2015). Effect of *Bacillus subtilis* Natto on Meat Quality and Skatole Content in TOPIGS Pigs. *Asian Australas. Journal of Animal Science*, 29(5): 716–721.
- Sherman, P.M., Johnson-Henry, K.C., Yeung, H.P., Ngo, P.S., Goulet, J., Tompkins, T.A. (2005). Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-

induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infection and Immunity*, 73: 5183-8.

Sistema de información agroalimentaria y pesquera (SIAP). 2016. Atlas Agroalimentario 2016 Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016)

Spreeuwenberg, M.A.M. (2002). Diet composition and gut integrity in weaned piglets, Ph.D. thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

Stanton, T. B. (2013). A call for antibiotic alternatives research. *Trends in Microbiology* 21, 111–113.

Stein, H.H. (2002). Experience of feeding pigs without antibiotics: a European perspective. *Animal Biotechnology* 13, 85–95.

Suardi, E., Crippa, F., D'arminio-Monforte, A. (2013). Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in adults. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* 8, 41–44.

Sun, P., Wang, J.Q., Zhang, H.T. (2010). Effects of *Bacillus subtilis* natto on performance and immune function of preweaning calves. *Journal of Dairy Science*, 93:5851–5855.

Tannock, G. W. (1988). The normal microflora; new concepts in health promotion. *Microbiological Sciences* 5, 4–8.

Thursby, E., Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474:1823–1836.

- Tokach, M.D., Goodband, R.D., Nelssen, J.L. (1992). Influence of weaning weight and growth during the first week post-weaning on subsequent pig performance. Swine Day, Kansas State University. pp 15-17.
- Trckova, M., Faldyna, M., Alexa, P., Sramkova-Zajacova, Z., Gopfert, E., Kumprechtova, D. (2014). The effects of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* on postweaning diarrhea, immune response, and growth performance in weaned piglets. *Journal of Animal Science*, 92:767–74.
- Tuohy, K.M., Rouzaud, G.C.M., Bruck, W.M. (2005). Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics-assessment of efficacy. *Current Pharmaceutical Design*, 11: 75-90.
- Urdaci, M.C., Pinchuk, I. (2004) Antimicrobial activity of *Bacillus* probiotics In: *Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications* (Ricca, E., Henriques, A.O. and Cutting, S.M., Eds.), pp. 171–182. Horizon Bioscience.
- USDA-FAS. (2016). Mexico, Livestock and Products Semi-annual. (<https://www.fas.usda.gov/data/mexico-livestock-and-products-semi-annual-0>)
- Wagner, R.D. (2008). Effects of microbiota on GI health: gnotobiotic research. GI microbiota and regulation of the immune system. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 635, 41–56.
- Wang, Y., Wu, Y., Wang, B., Cao, X., Fu, A., Li, A., Li, W. (2017). Effects of probiotic *Bacillus* as a substitut for antibiotics on antioxidant capacity and intestinal autophagy of piglets. *AMB Express*, 7:52.
- Wang, S.P., Yang, L., Tang, X.S., Cai, L.C., Liu, G., Kong, X.F., Yin, Y.L. (2011). Dietary supplementation with high-dose *Bacillus subtilis* or *Lactobacillus reuteri* modulates cellular and humoral immunities and

improves performance in weaned piglets. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 9(2), 181–187.

Weichselbaum, E., (2009). Probiotics and health: a review of the evidence. *Nutrition Bulletin* 34, 340–373.

Williams, I.H. (2003). Growth of the weaned pig. In: J. R. Pluske, J. V. Le Dividich, M. W. A. Verstegen (eds), *Weaning the Pig: Concepts and Consequences*, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands, pp. 17.

Williams, N.H., Stahly, T.S., Zimmerman, D.R. (1997). Effect of level of chronic immune system activation on the growth and dietary lysine needs of pigs fed from 6 to 112 kg. *Journal of Animal Science*, 75:2481–2496.

Yang, G.Y., Zhu, Y.H., Zhang, W., Zhou, D., Zhai, C.C., Wang, J.F. (2016). Influence of orally fed a select mixture of *Bacillus* probiotics on intestinal T-cell migration in weaned MUC4 resistant pigs following *Escherichia coli* challenge. *Veterinary Research*, 2016;47:71.

Zani, J.L., Dacruz, F.W., Dossantos, A.F., Gilturnes, C. (1998). Effect of probiotic CenBiot on the control of diarrhoea and feed efficiency in pigs. *Journal of Applied Microbiology* 84, 68-71.

Zheng, G., Slavik, M.F. (1999). Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. *Letters of Applied Microbiology*, 28:363–367.