

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**



**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE UN PROBIÓTICO A LA  
DIETA DE CERDOS EN ESTRÉS POR CALOR SOBRE  
LA COMPOSICIÓN DE SU MICROBIOTA INTESTINAL**

**T E S I S**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO BIOTECNÓLOGO AGROPECUARIO**

**PRESENTA**

**ANGELICA MORALES BECERRA**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. ADRIANA MORALES TREJO**

**Mexicali, Baja California**

**Junio de 2024.**

La presente tesis titulada “**Efecto de la adición de un probiótico a la dieta de cerdos en estrés por calor sobre la composición de su microbiota intestinal**”, realizada por C. Angélica Morales Becerra; 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 título de:

**INGENIERO BIOTECNÓLOGO AGROPECUARIO**

**Comité particular**

---

Dra. Adriana Morales Trejo

**Directora de Tesis**

---

Dr. Miguel Cervantes Ramírez

**Sinodal**

---

M. C. Fernanda González Aragón

**Sinodal**

**“POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER”**

Ejido Nuevo León, Mexicali, B.C. México; Junio de 2024.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer al Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California por darme la oportunidad de desarrollarme en la carrera de Ingeniero Biotecnólogo Agropecuario.

Agradezco a mi directora de tesis Adriana Morales Trejo, por todo el apoyo que me dio desde que inició el desarrollo de esta tesis, como el tiempo dedicado para poder llevar a cabo esto, pero sobre todo por creer y confiar en mí en todo momento, siempre estuvo al pendiente de mis avances y me brindaba seguridad para poder seguir adelante, agradezco mucho su paciencia y sus consejos los cuales siempre fueron fundamento para seguir con el desarrollo de este trabajo, me hizo tomar mi trabajo con seriedad y profesionalismo al mismo tiempo de seguir desarrollándome como persona profesional, un trabajo de investigación no es fácil y sin mi directora en tesis no lo hubiera concretado. Le tengo mucho aprecio.

A la maestra Fernanda González Aragón, por su apoyo y asesoría en la redacción de esta tesis, estuvo al pendiente en este proceso y su amplio conocimiento y la manera de explicar facilitaba mi aprendizaje.

Al Dr. Miguel Cervantes y a todos los que conforman el Cuerpo Académico de Nutrición Animal, todos ellos estuvieron apoyándome y aceptándome en su equipo de trabajo, hicieron mi trabajo de tesis más ameno, y pude llevarme muchas enseñanzas, gracias por sus consejos.

## DEDICATORIA

A mis padres Martin e Imelda:

Por siempre creer en mí en todo momento, por apoyarme y brindarme siempre su amor incondicional, sin ustedes yo no podría haber hecho esto, son mi motor a seguir y mi motivación para superarme.

A Lupita Becerra:

Por ser mi segunda mamá y apoyarme desde siempre, gracias por tu compañía por tu amor.

A mi hermano Tin:

Quiero ser tu ejemplo que los sueños se cumplen y que el esfuerzo vale la pena, quiero ser tu fuente de inspiración para que cumplas tus propios sueños.

A Andrés Palomera:

Por acompañarme en este proceso importante para mí, por tu amor y tu compañía que me daban fuerzas para seguir con esta tesis.

A mis amigos que estuvieron siempre al pendiente de mi proceso y me brindaron el cariño para seguir adelante.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

I.	RESUMEN .....	1
II.	ABSTRACT .....	2
III.	INTRODUCCIÓN .....	3
IV.	MARCO TEORICO .....	5
	4.1 Producción Porcina en México .....	5
	4.2 Efectos del calentamiento global y temperatura ambiental alta en la producción porcina.....	6
	4.3 Impacto del estrés por calor en la fisiología de los cerdos .....	7
	4.4 Tracto gastrointestinal de cerdos .....	9
	4.5 Microbiota intestinal en cerdos .....	13
	4.6 Probióticos.....	14
	4.7 <i>Bacillus</i> como probiótico para cerdos .....	17
V.	JUSTIFICACIÓN .....	19
VI.	HIPÓTESIS .....	20
VII.	OBJETIVO .....	21
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
	8.1 Generalidades .....	22
	8.2 Toma de muestras de contenido intestinal .....	24
	8.3 Extracciones de ADN de contenido intestinal y cuantificación .....	25
	8.4 Análisis estadístico .....	27
IX.	RESULTADOS.....	28
X.	DISCUSIÓN .....	32
XI.	CONCLUSION .....	37
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición de las dietas experimentales. ....	24
Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para análisis de abundancia relativa de microorganismos en contenido intestinal. ....	27

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Promedios de Índice de Temperatura y Humedad (ITH) dentro de las salas en donde se alojaron los cerdos en termoneutralidad y estrés por calor. ....	28
Figura 2. Cambios relativos en la población de Lactobacillus, Bifidobacterium, E. coli, y Bacillus en intestino de cerdos alimentados con una dieta adicionada con un probiótico a base de Bacillus subtilis. (Cuantificación de ADN específico de cada organismo en relación al ADN de bacterias totales analizado por qPCR). ....	311

## I. RESUMEN

Mexicali se caracteriza por su clima cálido-seco con temperatura media de 42 °C durante el verano, esta condición provoca estrés por calor (EC) y dificulta la producción animal. Los cerdos son muy sensibles al EC, y en estas condiciones experimentan alteraciones en su integridad y microbiota intestinal. Se analizó el efecto de la adición de un probiótico a base de *Bacillus subtilis* a la dieta de cerdos en EC, sobre la abundancia de *E. coli*, *Bifidobacterium sp.*, y *Lactobacillus sp.* en intestino delgado. Se emplearon diez cerdos canulados en íleon, con  $35.9 \pm 6.2$  kg de peso vivo, alojados en dos salas, una de ellas con temperatura ambiental regulada de 24 °C (sala termoneutral, TN); y otra sala sujeta a las variaciones diarias de temperatura en el verano en el valle de Mexicali (sala de EC). En un primer período, los cerdos se alojaron en la sala EC y fueron divididos en: 1) alimentados con la dieta base (EC-B), y 2) alimentados con la dieta base adicionada con 0.05% de probiótico (EC-P). En el segundo período, en la sala TN, los cerdos fueron alimentados con la dieta base (TN-B). Al término de siete días de alimentación de los cerdos con sus dietas respectivas se colectaron muestras de contenido ileal y se analizó la abundancia de ADN de los microorganismos mencionados. Los cerdos EC-B tendieron a reducir la abundancia de *Lactobacillus sp.* en comparación con los cerdos TN-B ( $P=0.08$ ), pero con la adición del probiótico (EC-P) su abundancia no fue diferente ( $P>0.10$ ). El EC y la adición de probiótico redujeron la abundancia de *Bifidobacterium sp.* ( $P<0.05$ ). La abundancia de *Escherichia coli* tendió a incrementarse ( $P<0.10$ ) en EC-B, pero el probiótico redujo su abundancia y ésta no fue diferente a TN-B ( $P>0.10$ ). El probiótico de *Bacillus subtilis* modifica la abundancia de los microorganismos *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, en el intestino delgado, lo que pudiera asociarse con efectos benéficos en la salud intestinal, absorción de nutrientes y parámetros productivos de los cerdos.

## II. ABSTRACT

Mexicali is characterized by its hot-dry climate with an average temperature of 42 °C during the summer. This condition causes heat stress (HS) and challenge the animal production. Pigs are very sensitive to HS, and under these conditions they experience alterations in their integrity and intestinal microbiota. The effect of adding a probiotic based on *Bacillus subtilis* to the diet of pigs in HS was analyzed on the abundance of *E. coli*, *Bifidobacterium sp.*, and *Lactobacillus sp.* in small intestine. Ten 35.9 ± 6.2 kg BW pigs, cannulated at ileum, were housed in two rooms, one of them with ambient temperature regulated to 24 °C (thermoneutral room, TN); and another room subject to daily temperature variations in the summer in the Mexicali Valley (HS room). In the first period, pigs were housed in the HS room and were divided into: 1) fed with a basal diet (HS-B), and 2) fed with the base diet added with 0.05% probiotic (HS-P). In the second period at TN room, pigs were fed the basal diet (TN-B). At the end of seven days of feeding the pigs with their respective diets, samples of ileal content were collected and the abundance of DNA of the aforementioned microorganisms was analyzed. HS-B pigs tended to reduce the abundance of *Lactobacillus sp.* compared to TN-B pigs (P=0.08), but with the addition of the probiotic (HS-P) its abundance was not different (P>0.10). EC and the addition of probiotic reduced the abundance of *Bifidobacterium sp.* (P<0.05). The abundance of *Escherichia coli* tended to increase (P<0.10) in HS-B, but the probiotic reduced its abundance and this was not different from TN-B (P>0.10). The probiotic of *Bacillus subtilis* modifies the abundance of *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* microorganisms in the small intestine, which could be associated with beneficial effects on intestinal health, nutrient absorption and productive parameters of pigs.



### III. INTRODUCCIÓN

En 2020, México ocupó el puesto número 13 como productor de cerdo a nivel mundial con 1,652 362 toneladas (SIAP, 2021); y aunque el consumo nacional de carne de cerdo per cápita se estima en 17.9 kg, el estado de Baja California aporta únicamente el 1.4% de la oferta nacional total (SIAP, 2022). Específicamente, en el municipio de Mexicali la producción porcina se realiza en pequeñas granjas familiares, cuyas condiciones carecen de un sistema de manejo tecnificado, con programas de salud y vacunación pertinentes. Lo anterior refleja la oportunidad con la que cuentan los técnicos, y productores para mejorar sus sistemas de producción porcina (Muñoz, 2018).

La región en que se encuentra Mexicali se caracteriza por su clima cálido-seco con precipitación anual inferior a 100 mm; durante el verano en esta región la temperatura media es de 42 °C, con nula precipitación y humedad relativa superior al 50% (Higuera et al., 2013) lo que dificulta la producción porcina, ya que los cerdos son una especie muy sensible al calor. Por su fisiología, los cerdos son animales homeotermos que en condiciones termoneutras mantienen constante su temperatura corporal (Rezende y Bacigalupe, 2015), pero en condiciones muy cálidas los cerdos manifiestan estrés por calor (EC). Una respuesta observada generalmente en los cerdos en EC es la reducción de la ingesta de alimento, misma que repercute directamente en su eficiencia productiva, reproductiva, y estado de salud (Collin et al., 2001; Lacetera et al., 2003; Cross et al., 2020). Se han propuesto algunas alternativas como la suplementación con antioxidantes, aminoácidos y minerales para contrarrestar los efectos del EC en cerdos (Sanz-Fernández et al., 2014; Pearce et al., 2015; Morales et al., 2021 y 2023). Otra de estas alternativas son también los probióticos que se caracterizan porque ayudan al huésped a establecer una microbiota intestinal saludable, y por consiguiente mejorar su salud y bienestar (Cho et al., 2011; Kenny et al., 2011).

*Bacillus subtilis* es un microorganismo que se emplea como probiótico, y que en cerdos se caracteriza porque puede mejorar la eficiencia en el uso de los nutrientes en el alimento de los cerdos durante la etapa de crecimiento y finalización, e incrementa la ganancia de peso, y es muy probable que tenga algún efecto positivo en el mantenimiento de una microbiota intestinal sana (Alexopoulos et al., 2004a; Cui et al., 2013).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de *Bacillus subtilis* como probiótico adicionado a la dieta de cerdos en estrés por calor, sobre la abundancia relativa de los microorganismos *E. coli*, *Bifidobacterium sp*, y *Lactobacillus sp* en intestino delgado.

## **IV. MARCO TEORICO**

### **4.1 Producción Porcina en México**

La carne de cerdo es la segunda carne más consumida en México, después de la carne de pollo (Bonales et al., 2015). Por sus características propias y de producción (crianza y alimentación), esta carne representa una fuente importante de nutrientes esenciales para el organismo, tales como proteínas, grasas, vitaminas y minerales, los cuales favorecen el desarrollo saludable del ser humano (Campion, 2013).

De acuerdo con SIAP (2021) en 2020 México ocupó el puesto número 13 entre los productores de cerdo a nivel mundial con 1,652 362 toneladas. El consumo per cápita nacional de carne de cerdo se estima en 17.9 kg. Además, estudios acerca de la demanda nacional e internacional de la carne de cerdo han demostrado que su consumo se ha incrementado en los últimos años, registrando una tasa anual media de crecimiento de 3.6%. Para cubrir la demanda del mercado, México importa principalmente canales completas y paletas de cerdo; mientras que, por otro lado, exporta carne de cerdo en cortes (SIAP, 2022).

Hasta el mes de mayo del 2022 en México, los estados con mayor producción de carne de cerdo fueron: Jalisco con 23 % de la producción nacional (191 035 toneladas); Sonora con 18% de la producción (149 016 ton); Puebla 10.5% (87 601 ton); Yucatán 9.6% (80, 013 ton); Veracruz 8.8% (73, 436 ton); y el resto de los estados 30 % del total (253 428 ton; SIAP, 2021).

La producción porcina en el estado de Baja California aporta únicamente el 1.4% de la oferta nacional total (SIAP, 2022). En el municipio de Mexicali, la producción porcina se realiza en pequeñas granjas familiares, cuyas condiciones carecen de un sistema de manejo tecnificado en las áreas de lactancia, maternidad, alimentación, crecimiento, etc., así también se carece

de cuidado correcto de sanidad y programas de vacunación pertinentes para el proceso de producción. Estos sistemas no siempre consideran, aspectos como el mercado, o la generación de un valor agregado para sus productos en beneficio de los clientes y productores. Lo anterior refleja la oportunidad con la que cuentan los técnicos, y productores para mejorar sus sistemas de producción porcina (Muñoz, 2018).

Por otro lado, la región en que se encuentra Mexicali se caracteriza por su clima cálido-seco con precipitación inferior a 100 mm anuales, durante el verano en esta región la temperatura media es de 42 °C, con nula precipitación y humedad relativa superior al 50% (Higuera et al., 2013) lo que dificulta la producción porcina, ya que los cerdos son una especie muy sensible al calor. Adicionalmente, múltiples estudios relacionados con el calentamiento global, demuestran que es muy probable que con el paso de los años las condiciones de clima y temperatura en Mexicali se vuelvan más extremas y propicien la presentación de múltiples signos de estrés en los animales (Quintero, 2013).

#### **4.2 Efectos del calentamiento global y temperatura ambiental alta en la producción porcina**

El concepto de calentamiento global, se refiere a la tendencia a incrementar la temperatura del planeta, misma que se ha observado durante los últimos 150 años y que se atribuye a las actividades y contaminación humana (Caballero y Lozano, 2007; Barboza., 2013). A éste se suma el concepto de cambio climático, que incluye las variaciones del clima asociadas a cambios en la actividad solar, actividad volcánica o geológica, circulación oceánica, composición de la atmósfera, etc. (Caballero y Lozano, 2007). Aplicando estos dos conceptos a la producción animal, es posible que se observe una limitante en la disponibilidad de cereales y otros insumos para la alimentación de los animales (Baumgard et al., 2012). Además, se espera que el impacto del

incremento en la temperatura ambiente afecte también el bienestar de los animales para producción de carne y otros productos pecuarios.

Es bien conocido que un porcentaje importante de la producción de carne se lleva a cabo en áreas del mundo en donde los animales se encuentran, temporal o permanentemente, expuestos a temperatura ambiente superior a su denominada temperatura de confort o zona termoneutral, lo anterior resulta en una condición de estrés por calor (EC) para los animales (Cervantes et al., 2018).

Como resultado del EC, en los cerdos se observa una depresión significativa en su consumo de alimento y rendimiento productivo (Kerr et al., 2003; Pearce et al., 2013), lo anterior impacta de manera crítica la economía de los productores. Se ha estimado que las pérdidas económicas por EC en la industria porcina en México podrían superar los \$100 millones de dólares al año (Cervantes et al., 2018). Por consiguiente, se debe considerar al EC como uno de los principales retos que actualmente enfrenta la producción animal (Cota, 2015).

#### **4.3 Impacto del estrés por calor en la fisiología de los cerdos**

El estrés por calor se ha definido como el conjunto de alteraciones en la fisiología, metabolismo, función inmune, y conductual que padecen los animales expuestos a condiciones de temperatura y/o humedad ambiental elevadas (Horowitz et al., 2004; Reneaudeau et al., 2010). De acuerdo con esta definición, en el organismo de los animales ocurren diversos cambios necesarios para combatir al EC.

Los cerdos son animales homeotermos que en condiciones termoneutrales mantienen constante su temperatura corporal (Rezende y Bacigalupe, 2015). En ambientes fríos, generan calor a través del aumento del metabolismo basal

(Adair y Black, 2003), pero al incrementar la temperatura y humedad ambiental, se observan cambios a diferentes niveles en su organismo que se traducen en estrés y baja producción.

En general, los efectos negativos del EC en la producción porcina se observan en mayor medida en las etapas de crecimiento y finalización, cuando los cerdos son más susceptibles al calor. En respuesta a la temperatura ambiental elevada, y para reducir la generación de calor por digestión, los cerdos reducen de manera importante la ingesta de alimento (Cross et al., 2020). Esta reducción en el consumo repercute en su eficiencia productiva, reproductiva, y estado de salud (Collin et al., 2001; Lacetera et al., 2003).

En cuanto a la conducta de los animales expuestos a EC se observa una marcada reducción en su actividad física; incremento en el consumo de agua y reducción en el consumo de alimento; contacto limitado con sus compañeros de corral; apatía o aletargamiento; búsqueda de lugares sombreados, frescos y húmedos (Godyń et al., 2020).

En temperatura superior a 24 °C, se activan mecanismos de adaptación que incluyen el jadeo para disipar calor corporal, lo anterior incrementa la frecuencia respiratoria y cardiaca en los animales (Huynh et al., 2005; Wilson y Crandall, 2011; Pearce et al., 2013), así también se observa que la circulación sanguínea se distribuye hacia la periferia con la finalidad de eliminar el calor por radiación y conducción a través de la piel (Huynh et al., 2005).

La temperatura corporal en cerdos depende de la temperatura ambiente, su producción de calor corporal y su capacidad de disiparlo. Cuando la temperatura ambiente supera su capacidad para eliminar el exceso de calor, se observan un aumento en la temperatura corporal, misma que de acuerdo con Morales et al., (2016) y Cervantes et al., (2017), puede incrementarse hasta 2.0 °C en cerdos expuestos a temperatura ambiental superior a 35 °C.

El estrés por calor se asocia también a una reducción en la irrigación sanguínea hacia intestino y otros órganos internos (Pearce et al., 2013), lo que pone en riesgo la integridad de la mucosa gastrointestinal, cuya función es proteger al organismo de las bacterias y endotoxinas bacterianas que normalmente habitan el intestino (Moseley y Gisolfi, 1993). En estas condiciones disminuye la eficacia de la barrera intestinal y aumenta la permeabilidad intestinal por inhibición de la mitosis e inducción de apoptosis en las criptas (Varedi et al., 2001, Prosser et al., 2004). A nivel microscópico se observa pérdida de continuidad en la superficie de las vellosidades intestinales y se reduce su altura; así también se acorta la profundidad de las criptas de mucosa intestinal; como consecuencia de todo ello se espera una reducción importante en la absorción de nutrientes (Yu et al., 2010).

#### **4.4 Tracto gastrointestinal de cerdos**

El cerdo es un animal de alimentación omnívora, que comercialmente es alimentado con dietas balanceadas elaboradas a base de cereales y pasta de soya (Seneviratne et al., 2011). Por la estructura de su estómago simple al cerdo se le considera un animal monogástrico, en este órgano inicia la digestión y desdoblamiento de alimentos ricos en nutrientes digestibles como proteínas, azúcares, grasas (Acosta, 2021).

De acuerdo con Macedo (2016), el tubo digestivo de los animales se conforma de distintas secciones, reservorios y glándulas anexas cuya secreción es importante para la digestión completa de los alimentos. En los cerdos el tubo se divide en: boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso y ano. Todas estas estructuras están conectadas y forman un tubo músculo-membranoso con funciones complejas e interactivas (De Rouchey, 2014).

A continuación, se describen algunas de las características más importantes de los órganos que conforman el aparato digestivo:

- **Boca:** sirve para prensar, tomar, humedecer y ensalivar el alimento. En esta cavidad se reduce el tamaño de las partículas mediante la masticación. Inicialmente sucede una reacción química cuando el alimento se mezcla con la saliva que contiene a la enzima amilasa encargada de iniciar el desdoblamiento del almidón que es abundante en los cereales (Acosta, 2021). Dentro de la boca los dientes muelen el alimento para reducir el tamaño de partícula y permitir que éstas sean mezcladas con la saliva. Una vez que se ha masticado el alimento, éste pasa hacia la faringe y luego al esófago hasta llegar al estómago (Solórzano, 2020).
- **Esófago:** órgano que se ubica entre la faringe y el estómago, y que contiene una cantidad importante de glándulas secretoras de mucina para favorecer la lubricación del bolo alimenticio, y es el órgano de tránsito hacia el estómago. El moco protege a la mucosa de los jugos gástricos que pudieran salir del estómago (Macedo, 2016). El movimiento del bolo alimenticio a lo largo de éste órgano requiere que haya movimientos peristálticos, que resultan de la contracción de la capa muscular de la pared del tubo digestivo para facilitar el desplazamiento del alimento (Solórzano, 2020).
- **Estómago:** Es responsable de almacenar e iniciar la digestión del alimento, y a continuación, de pasar la digesta hacia el intestino delgado. En animales adultos, su capacidad varía entre 6 y 8 litros. Se divide en cuatro regiones: esofágica, cárdica, fúndica y pilórica (De Rouchey, 2014). La región esofágica inicia en el esfínter cárdico que permite la entrada y evita la salida del bolo alimenticio del estómago, en esta región no se secretan enzimas digestivas. En la región cárdica, las glándulas cardias secretan mucina que recubre el interior del estómago para protegerlo de las secreciones ácidas. En la región fúndica comienza el proceso de



digestión con la secreción de ácido clorhídrico y pepsinógeno en las glándulas gástricas, esta región tiene un pH bajo de 1.5 a 2.5 para facilitar la digestión y eliminar bacterias ingeridas en el alimento. En la región pilórica también hay secreción de mucina, esta región termina en el píloro o esfínter pilórico, que actúa como una válvula regulando la salida del bolo digestivo hacia el intestino (De Rouche, 2014).

A continuación del estómago, el intestino se divide en dos partes: intestino delgado e intestino grueso.

- **Intestino delgado.** Esta sección está encargada de continuar la digestión del alimento hasta liberar sus nutrientes (glucosa, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, minerales, etc.) para además realizar la absorción de los mismos. El intestino delgado recibe secreciones de la vesícula biliar y del páncreas, que en conjunto con el jugo intestinal facilitan la función del intestino. La pared intestinal se contrae para mezclar su contenido y propulsarlo hacia la parte posterior del intestino (Solórzano, 2021). El intestino delgado comprende tres secciones: duodeno, yeyuno e íleon (De Rouche, 2014, Solórzano, 2021), que a continuación se describen brevemente.

**Duodeno:** Abarca aproximadamente el 5% inicial de la longitud total del intestino, en la primera porción de esta sección se encuentra un engrosamiento de la pared en donde se presentan de glándulas que liberan bicarbonato de sodio para neutralizar el pH del contenido precedente del estómago (Moran, 2018). A más o menos 15 cm del píloro se encuentra la desembocadura común de los conductos biliar y pancreático, allí se vierten sus secreciones de enzimas pancreáticas y sales biliares para la digestión de proteínas y grasas, respectivamente (Lewis y Southern, 2000).

**Yeyuno:** Se continua del duodeno, mide entre 15 y 20 metros de longitud y está dispuesto de tramos en forma de asa (Lewis y Southern, 2000). Además de continuar la digestión del quimo, la principal función que efectúa el yeyuno es la absorción de nutrientes (Lagos, 2021).

**Íleon:** es el último tramo del intestino delgado, se caracteriza por ser la última sección importante para la absorción de nutrientes, además de que sus movimientos peristálticos impulsan a los contenidos sin digerir, ricos en fibra, hacia el intestino grueso. El íleon continúa hacia el intestino grueso o colon a través de la válvula ileocecal (Moran, 2018).

- **Intestino grueso.** El intestino grueso se compone de tres secciones: el ciego, el colon y el recto. El cerdo tiene un ciego corto y un colon largo. El ciego es un saco cilíndrico que recibe el contenido del intestino delgado y una vez procesado el quilo sale hacia el colon. En el ciego se lleva a cabo la digestión de fibra y otros nutrientes que no alcanzaron a digerirse en intestino delgado. El quilo que sale del ciego pasa a colon cuyas asas están dispuestas en una serie de espirales en este sitio de realiza principalmente la absorción de agua. A continuación del colon, el recto se dilata para formar una ampolla inmediatamente antes de terminar en el ano, por el cual se excreta el contenido en forma de heces (De Rouchey, 2014).

En intestino grueso no hay digestión enzimática, sin embargo, algunos microorganismos realizan la digestión de fibra y otros residuos del quilo, y forman ácidos grasos volátiles (AGV), que son absorbidos en el intestino grueso (De Rouchey, 2014). Los AGV proveen energía y nutren a las células del epitelio del intestino grueso. Algunas vitaminas del complejo B también se sintetizan en el intestino grueso y se absorben en cantidades pequeñas, pero no significativas como para afectar el requerimiento nutricional (De Rouchey, 2014).

#### **4.5 Microbiota intestinal en cerdos**

Icaza-Chávez (2013), definió a la microbiota intestinal como la comunidad de microorganismos vivos residentes en el tubo digestivo que es indispensable para el crecimiento corporal, el desarrollo de la inmunidad y la nutrición.

La microbiota intestinal cumple con actividades biológicas que el hospedero no siempre tiene la capacidad de realizar, tales como, metabolizar o sintetizar algunos nutrientes, estimular el desarrollo del aparato digestivo y estimulación del sistema inmune (Kayama y Takeda, 2020). En animales con buena salud, la composición de la microbiota es estable, pero algunos factores de estrés, como alergias, estrés de alimentación, mal uso de antibióticos, y/o enfermedades pueden alterar la microbiota intestinal, provocando una inestabilidad en el sistema de defensa y colonización de patógenos, los cuales causan problemas digestivos, e incluso pueden causar la muerte (Zheng et al., 2020).

La respuesta inmunitaria de los animales puede estimularse en diversos casos, por ejemplo, en situaciones de infección e inmunodeficiencia, o bien, suprimirse en situaciones de alergia y enfermedades autoinmunes (Borchers et al., 2009). En estas ocasiones la microbiota intestinal juega un papel importante al estimular la producción de anticuerpos, y aumentar la actividad fagocítica (respuesta inmunitaria gastrointestinal), e incluso puede respaldar sistemas de defensa contra patógenos invasores (Yirga., 2015). De acuerdo con Fuller (1991), dos formas en las que puede estimularse el sistema inmunitario son: 1) que los microorganismos migren a través de la pared intestinal como células viables o bien se multipliquen y sean detectados por las células de defensa; y 2) que los antígenos liberados por los organismos muertos, se absorban y estimulen directamente el sistema inmunitario del huésped.

## 4.6 Probióticos

Los probióticos, son microorganismos vivos que administrados en el alimento se emplean para mantener sana la microbiota intestinal, estos ayudan a conservar la población microbiana intestinal benéfica y proteger al organismo contra microorganismos nocivos (Cho et al., 2011). Al estar constituidos de microorganismos viables, con una buena administración y en cantidades adecuadas, los probióticos pueden proporcionar efectos positivos en la salud del huésped. Estos microorganismos no son patógenos, ni producen efectos secundarios nocivos; por lo que se consideran una alternativa al uso de antibióticos (Sanders, 2003).

Los probióticos se aplican como suplemento en la dieta de los animales, y se pueden emplear en todas las fases de la producción porcina, con propósitos como mejorar el rendimiento, mitigar enfermedades, aumentar la productividad, o bien reducir contaminantes del alimento (Barba-Vidal et al., 2019)

Los probióticos estimulan las funciones protectoras del aparato digestivo. También se consideran terapéuticos, protectores o profilácticos y se utilizan para prevenir las infecciones gastrointestinales (Penna., 1998). De acuerdo con Pardo et al. (1994), los probióticos deben cumplir con los siguientes postulados de Hucheston:

- 1) Tiene que ser habitante del intestino
- 2) Debe tener un tiempo corto de reproducción
- 3) Debe ser capaz de producir compuestos antimicrobianos
- 4) Debe ser estable durante el proceso de producción
- 5) Tiene que ser resistente para que pueda llegar vivo al intestino para su distribución.

De acuerdo con Fuller (1991) existen cuatro mecanismos de acción fundamentales en los probióticos:

1ª. Producción de antibióticos: con ellos pueden minimizar la población de otros microorganismos, interferir en su metabolismo y en la producción de toxinas. También pueden interferir la síntesis de ácidos grasos volátiles como el ácido láctico de los lactobacilos, los cuales reducen la colonización de patógenos en el intestino.

2ª. Competencia por receptores de adhesión: algunos microorganismos probióticos se adhieren a la pared del intestino evitando la adhesión de otros microorganismos.

3ª. Competencia por nutrientes: esto es poco probable, pero podrían reducir la abundancia de un nutriente específico e podría influir en la composición de la microbiota.

4ª. Estimulación de la inmunidad: por ejemplo, los lactobacilos estimulan la actividad de los macrófagos para el reconocimiento y eliminación de antígenos y evitan su llegada al torrente sanguíneo.

Otro mecanismo de acción de los probióticos es su contribución en la mejora de la función de la barrera intestinal a nivel de interacción entre enterocitos, al parecer porque habría especies que modulan la fosforilación de proteínas del citoesqueleto y de unión estrecha, y por ello se fortalecen las interacciones célula-célula de la mucosa intestinal (Willing et al., 2012).

De acuerdo con las características descritas previamente, en numerosos trabajos se ha concluido que la suplementación con probióticos mejora el rendimiento del crecimiento y la inmunidad intestinal, mejora así la función de la barrera intestinal, y suprime el crecimiento de patógenos en el tracto gastrointestinal (Resta-Lenert y Barrett, 2006; Bermudez-Brito et al., 2012; Liao y Nyachoti, 2017).

Algunos organismos empleados como probióticos para la alimentación pertenecen a los géneros: *Lactobacillus sp.* y *Bifidobacterium sp.*, éstos organismos son anaerobios estrictos que tras la fermentación de los alimentos producen ácido láctico, el cual también actúa como conservador. Además, se pueden emplear microorganismos no como las levaduras *Saccharomyces boulardii* y bacterias no patógenas del género *Streptococcus thermophilus* (Riechmann y Calatayud, 2013). La principal aplicación de los diferentes probióticos es prevenir infecciones y problemas en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, debe quedar claro que los probióticos no se aplican con un enfoque curativo para eliminar bacterias patógenas, como sería el caso de los antibióticos, sino como promotores de crecimiento y moduladores de la microbiota intestinal, reduciendo el riesgo de enfermedades de manera sinérgica con el sistema inmune del huésped (Gaggia et al., 2010).

En general, el objetivo del uso de probióticos en la producción porcina es favorecer el establecimiento de una microbiota intestinal saludable, y por consiguiente mejorar la salud y bienestar de los cerdos (Cho et al., 2011; Kenny et al., 2011). Existe una cantidad importante de microorganismos que han sido probados como probióticos para la suplementación de cerdos. En un trabajo de revisión realizado por Flores et al. (2020), se indicó que bacterias lácticas tienen efecto importante en modular la respuesta inmune y prevenir la presentación de diarreas en cerdos, esto es el caso de *Lactobacillus* de los géneros *L. acidophilus*, *L. elbrueckii*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*. Otros trabajos indican los beneficios de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, y *E. faecium* en la mejora de parámetros productivos y reducción de mortalidad en granjas porcinas (Flores et al., 2020).

#### **4.7 *Bacillus* como probiótico para cerdos**

Las bacterias del género *Bacillus* son gram positivas, anaerobias facultativas, formadoras de esporas, comúnmente asociadas con suelo, agua y aire; y productoras de sustancias antimicrobianas y de enzimas hidrolasas (Sanders et al., 2003). Dentro del género *Bacillus* existen especies que tienen importancia como probióticos, entre ellos están *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. natto* (Guillot, 2000; Bortolozzo y Kira, 2002). La producción de enzimas hidrolíticas en *Bacillus* ayuda a mejorar la utilización de los alimentos, tal es el caso de las enzimas proteasas, amilasas y glicosidasas, que participan en la descomposición de moléculas complejas de los alimentos, transformándolas en nutrientes más simples. Estos nutrientes pueden ser absorbidos rápidamente por el animal, o bien pueden ser empleados por otras bacterias benéficas para el establecimiento de una microbiota intestinal balanceada (Milian et al., 2008).

De acuerdo con Cutting (2011), el uso de *Bacillus* como probiótico en la dieta, ha tenido una expansión rápida, ya que se han reportado varios efectos benéficos, como estimulación de la respuesta inmune, síntesis de compuestos con actividad antimicrobiana, y exclusión competitiva, entre otras. Estas bacterias son capaces de crecer y colonizar el tracto gastrointestinal y se han considerado como residentes normales del mismo.

Se ha reportado que la administración de *Bacillus subtilis* como probiótico en cerdos, regula la microbiota intestinal, y mejora la eficiencia en el uso de alimentos en aproximadamente un 10% durante la etapa de crecimiento y finalización, e incrementa hasta un 8% la ganancia de peso (Alexopoulos et al., 2004a; Cui et al., 2013). Administrado a cerdas gestantes durante el parto y lactancia, se obtiene un mayor rendimiento en la camada, reducción de diarrea en lechones, mayor de peso al destete, y disminución de mortalidad (Alexopoulos et al. 2004b). En cerdas en lactación también se ha observado mayor proporción de grasa y proteínas en leche, beneficiando a los lechones;

y en cerdos en crecimiento mejora su rendimiento, conversión alimenticia, y calidad de la carne (Alexopoulos et al, 2004a).



## **V. JUSTIFICACIÓN**

Para que los cerdos en crecimiento puedan manifestar su máximo potencial, además de contar con un buen manejo y una buena alimentación, es necesario que cuenten con una microbiota intestinal saludable y equilibrada. Es por ello que se espera que la suplementación de la dieta con un probiótico, especialmente en cerdos vulnerables, como es el caso de aquellos criados en condiciones climáticas son extremadamente calurosas, podría tener un efecto benéfico para mantener una microbiota equilibrada en favor de la salud y nutrición adecuada de los animales, lo que deberá reflejarse en un mejor comportamiento productivo.

## VI. HIPÓTESIS

La adición de un probiótico a base de *Bacillus subtilis* a la dieta de cerdos en crecimiento criados en condiciones de en estrés por calor, modifica la abundancia de otros microorganismos como *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, en el intestino delgado de los cerdos.

## VII. OBJETIVO

Evaluar el efecto de la adición de un probiótico de *Bacillus subtilis* a la dieta de cerdos en crecimiento en condiciones de estrés por calor, sobre la abundancia relativa de *E. coli*, *Bifidobacterium sp.*, y *Lactobacillus sp.* en intestino delgado.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Generalidades

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Ciencias Agrícolas, de la Universidad Autónoma de Baja California, ubicado en el Ejido Nuevo León del municipio de Mexicali, Baja California, México. La fase de campo se llevó a cabo durante el mes de agosto de 2021 en la Unidad de Fisiología y Metabolismo de cerdos y posteriormente el trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Nutrigenómica de esta institución.

Todos los cerdos empleados para este trabajo fueron manejados de acuerdo con los lineamientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (2001).

El trabajo se llevó a cabo con diez cerdos, cinco hembras y cinco machos de raza cruzada de Landrace x Yorkshire x Duroc con un peso promedio inicial de  $35.9 \pm 6.2$  kg de peso vivo. Previamente todos los cerdos fueron adaptados quirúrgicamente con una cánula tipo "T" en íleon terminal, de acuerdo con la metodología descrita por Sauer et al. (1983) que, para el momento del experimento, ya se habían recuperado por completo. Los cerdos fueron alojados en jaulas individuales de piso elevado y plastificado con medidas de 1.2 x 1.2 m, equipadas con comedero de acero inoxidable y bebedero de tipo chupón, dentro de dos salas. Una de las salas, denominada sala de termoneutralidad, cuenta con un equipo de aire acondicionado, cuyo termostato fue ajustado para mantener la temperatura ambiental a 24 °C que es la temperatura confort de los cerdos. La segunda sala, que no cuenta con equipo de aire acondicionado, estuvo sujeta a las variaciones diarias de temperatura que, en la época de verano cuando se realizó el trabajo, supera regularmente los 40 °C, ésta será referida como sala de estrés por calor.

Los cerdos tuvieron un período de adaptación de cinco días antes del comienzo del experimento, durante éste se les ofreció la dieta base y se adaptaron al manejo que llevarían durante el período experimental. Los cerdos fueron pesados al inicio del experimento para verificar que tuvieran pesos similares. La alimentación de los cerdos consistió en ofrecerles 1200 g de alimento por día, dividido en dos porciones iguales a las 0700 h y 1900 h; el alimento se sirvió húmedo con la relación 1:1 de alimento y agua. El agua de bebida estuvo disponible *ad libitum* para todos los animales.

Se tuvieron dos períodos experimentales de ocho días cada uno. En el primer período experimental, los cerdos fueron alojados en sus jaulas individuales dentro de la sala de estrés por calor y asignados a dos tratamientos: 1) estrés por calor alimentados con la dieta base (EC-B), y 2) estrés por calor alimentados con la dieta base adicionada con 0.05% de probiótico que contenida con  $10^9$  UFC/gr de *Bacillus subtilis* DSM 32540. (EC-P). En el segundo período, después de una semana de adaptación a la sala de termoneutralidad, los cerdos se alimentaron con la misma dieta base (TN-B, tratamiento 3).

La dieta base se elaboró con trigo y pasta de soya como ingredientes principales, así como lisina, treonina y metionina para cubrir los requerimientos de mantenimiento para cerdos de 25-50 kg de peso vivo (NRC, 2012). En el Cuadro 1 se presenta la composición de las dietas experimentales.

Se colocó un higrotermógrafo (Thermotracker Higo) dentro de la sala en donde se alojaron los animales para registrar la temperatura ambiental y humedad relativa cada 15 minutos, con esos datos se estimó el índice de calor a que estuvieron sujetos los animales (Steadman, 1979; Rothfusz, 1990).

Cuadro 1. Composición de las dietas experimentales.

Ingredientes	Dieta base, %	Dieta adicionada con probiótico, %
Trigo	76.48	76.48
Pasta de soya, 48 %	20.00	20.00
L-Lisina • HCl	0.39	0.39
L-Treonina	0.14	0.14
DL-Metionina	0.14	0.14
Probiótico ( <i>Bacillus subtilis</i> DSM 32540)	-	0.05
Carbonato de calcio	1.25	1.25
Fosfato dicálcico	0.80	0.80
Sal iodada	0.35	0.35
Premezcla de vitaminas y minerales	0.40	0.40

## 8.2 Toma de muestras de contenido intestinal

Los días 6 y 7 de los períodos de exposición a estrés por calor y termoneutralidad, se colectó el contenido ileal de los animales durante el periodo de 12 h consecutivas, esto desde las 0700h hasta las 1900h. La colecta de material se realizó colocando bolsas de plástico en la salida del barril de la cánula durante 15 minutos o bien hasta que se recolectara una buena cantidad de material, sustituyendo la bolsa por una nueva. Todo el material del mismo animal se colocó en un recipiente, posteriormente se mezcló y se conservó en congelación a -20 °C para análisis de composición del microbiota intestinal.

Las muestras colectadas de contenido intestinal se descongelaron en frío y una vez que estuvieron casi totalmente descongeladas se homogenizaron en una licuadora, y posteriormente se formaron alícuotas en tubos de 2 ml que fueron congeladas hasta el momento de su procesamiento en laboratorio.

### **8.3 Extracciones de ADN de contenido intestinal y cuantificación**

Se verificó que todas las muestras de contenido intestinal tuvieran una apariencia homogénea (sólida - pastosa). Antes de iniciar la extracción de ADN las alícuotas de muestras fueron descongeladas en hielo para evitar cualquier proceso de fermentación o crecimiento de microorganismos. La extracción de ADN de cada muestra se realizó a partir de una sub-muestra de aproximadamente 30 mg de contenido intestinal, misma que se colocó en un microtubo estéril de 2 ml, y se le añadieron 1000  $\mu$ l de reactivo DNAzol (Invitrogen, California, EUA). La muestra se mezcló agitando por inversión con el reactivo y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente para lograr la lisis del material biológico. Concluida la incubación el tubo se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos. Se recuperó un volumen de 800  $\mu$ l del sobrenadante y para precipitar el ADN se añadieron 500  $\mu$ l de etanol al 100 %, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos para precipitar el ADN al fondo del tubo, concluida la centrifugación se descartó el sobrenadante. La pastilla de ADN fue lavada por inversión con 800  $\mu$ l de etanol al 75 % e incubado 1 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos, este procedimiento se realizó dos veces para eliminar impurezas en la pastilla de ADN. Al terminar se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla manteniendo el tubo destapado durante 5 minutos para la evaporación del etanol. Por último, la pastilla de ADN fue disuelta en 60  $\mu$ l de agua libre de nucleasas.

Se verificó la integridad del ADN genómico recién purificado mediante electroforesis de una alícuota de 3  $\mu$ l de ADN en gel de agarosa al 1.0%. La concentración del ADN de cada muestra fue determinada mediante el análisis de su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Genesys 50, Thermo Scientific, EEUU).

Se utilizaron oligonucleótidos específicos para detectar la presencia y abundancia de *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.*, y Bacterias totales (ADN ribosomal 16S), ésta última se utilizó como referencia para normalizar las variaciones en la cantidad de ADN. Las secuencias de los oligonucleótidos y su referencia original se muestran en el Cuadro 2. La abundancia de cada uno de los microorganismos mencionados, se analizó realizando ensayos cuantitativos de reacción en cadena de la polimerasa (qPCR). Para ello se empleó el kit comercial Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador de tiempo real modelo CFX96 Touch (BioRad, Herefordshire, England). Se utilizaron microtubos de 200  $\mu$ l con tapas ópticas (BioRad) a un volumen final de 25  $\mu$ l; para cada reacción se utilizaron 12.5  $\mu$ l de SYBR Green Mix, 8.5  $\mu$ l de agua libre de nucleasas, 3  $\mu$ l de Oligo Mix con oligonucleótidos específicos sentido y antisentido a concentración de 5  $\mu$ M de cada uno; y 1  $\mu$ l de ADN genómico a concentración de 50 ng/ $\mu$ l. Todas las muestras se analizaron por duplicado, y al mismo tiempo se analizó tanto el microorganismo blanco como de ARN ribosomal 16S (bacterias totales) que se usó como referencia. Para cada análisis se utilizaron controles negativos por duplicado a los cuales se les retiró alguno de los siguientes elementos: 1) reacción sin DNA; 2) reacción sin Oligo Mix; 3) reacción sin SYBR Green Mix. El programa de reacción en el termociclador fue: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, 40 ciclos (desnaturalización a 95 °C por 15 segundos, alineación a 54-60 °C -ver Cuadro 2- por 15 segundos, y extensión a 72 °C por 30 segundos). Se midió la fluorescencia de las muestras al finalizar cada ciclo, y posteriormente se realizó una curva de desnaturalización de 65 °C a 95 °C, en la que se midió la fluorescencia cada 0.5°C.

El cálculo de la abundancia relativa de cada microorganismo se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Livak y Schmittgen (2001),



considerando la ecuación de diferencia del ciclo crítico de amplificación ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para análisis de abundancia relativa de microorganismos en contenido intestinal.

<b>Microorganismo</b>	Secuencia del oligonucleótido (5'→3')	Fragmento amplificado (pb)	Temp. de alineación
<b><i>Escherichia coli</i></b> (Lee et al., 2010)			
	Sentido 5'AGAAGCTTGCTCTTTGCTGA3'	120	54 °C
	Antisentido 5'CTTTGGTCTTGCGACGTTAT3'		
<b><i>Lactobacillus sp.</i></b> (Han et al., 2011)			
	Sentido 5'CGATGAGTGCTAGGTGTTGGA3'	186	56 °C
	Antisentido 5'CAAGATGTCAAGACCTGGTAAG3'		
<b><i>Bacillus sp.</i></b> (Han et al., 2012)			
	Sentido 5'ACGCCGTAAACGATGAGT 3'	424	60 °C
	Antisentido 5'GTGTGTAGCCCAGGTCATAA3'		
<b><i>Bifidobacterium sp.</i></b> (Kaufmann et al., 1997)			
	Sentido 5'GATTCTGGCTCAGGATGAACG3'	1400	56 °C
	Antisentido 5'CGGGTGCTNCCCACCTTTCATG3'		
<b>Bacterias totales</b> (Han et al., 2011)			
	Sentido 5'GCAGGCCTAACACATGCAAGTC3'	315	56 °C
	Antisentido 5'CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT3'		

#### 8.4 Análisis estadístico

Los resultados de abundancia relativa de ADN (diferencia de Ct, Livak y Schmittgen, 2001) se analizaron mediante análisis de varianza y comparación de medias con el software Statistix 9.0 (Analytical Software). Los valores donde  $P < 0.05$  se consideraron diferentes estadísticamente y los valores donde  $0.05 > P > 0.10$  se consideraron tendencias.

## IX. RESULTADOS

Dentro de la sala de termoneutralidad el promedio de temperatura ambiente durante los días en que se llevó a cabo este estudio fue de  $22.8 \pm 2.9$  °C, y la humedad relativa fue en promedio de  $58.0 \pm 7.2$  %. Mientras que dentro de la sala de estrés por calor la temperatura promedio fue de  $36.6 \pm 2.6$  °C, con humedad relativa de  $61.9 \pm 11.6$  %.

La temperatura ambiental en la sala EC supero los 35°C entre las 12:00 y las 20:00 horas durante todo el período, registrando el pico de temperatura más alta entre las 14:00 y las 18:30 horas, con temperatura ambiente superior a los 37 °C.

En la Figura 1 se muestra el promedio de las variaciones diarias del índice de calor a que estuvieron expuestos los cerdos de este experimento dentro de las salas termoneutral y de estrés por calor. En promedio el índice de calor en la sala termoneutral fue de  $77.5 \pm 2.5$ , mientras que el promedio de índice de calor dentro de la sala de estrés por calor fue de  $106.4 \pm 4.8$ .

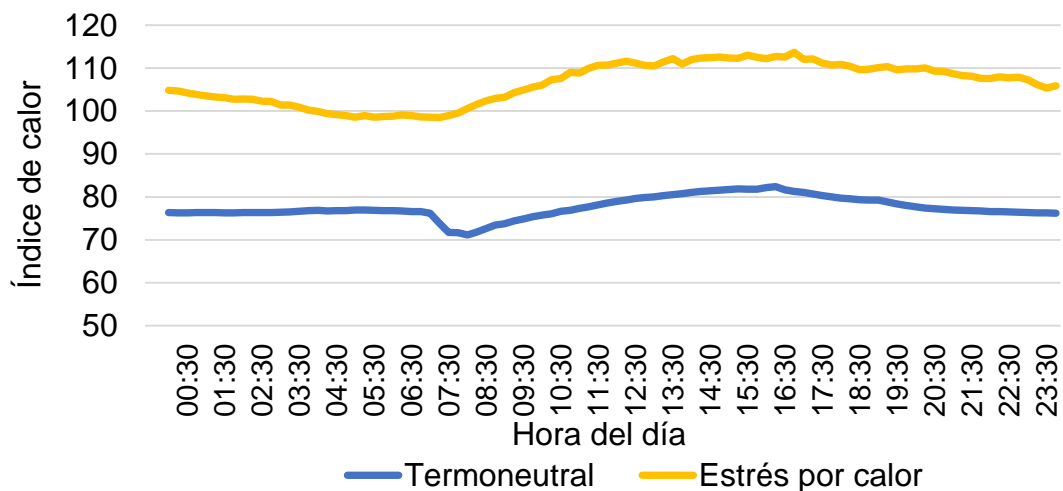


Figura 1. Promedios de Índice de Temperatura y Humedad (ITH) dentro de las salas en donde se alojaron los cerdos en termoneutralidad y estrés por calor.

Los resultados de abundancia relativa de ADN de los microorganismos *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Escherichia coli*, y *Bacillus sp.* analizados en contenido de intestino delgado de los cerdos se presentan en la Figura 2.

Se observó una tendencia a reducir en un 34% la abundancia microorganismos del género *Lactobacillus sp.* en el intestino delgado de los cerdos que se mantuvieron en condiciones de estrés por calor alimentados con dieta base en comparación con los cerdos bajo condiciones termoneutrales ( $P = 0.089$ ). Por otra parte, la suplementación con el probiótico a los cerdos en estrés por calor provocó una recuperación en la abundancia relativa de ADN de esa misma especie en intestino delgado de los cerdos, la cual fue similar a la abundancia observada en los cerdos en condiciones termoneutrales alimentados con la dieta base ( $P = 0.530$ ).

Independientemente de la dieta recibida, el estrés por calor redujo al 56% la abundancia relativa del ADN de microorganismos del género *Bifidobacterium sp.* en intestino delgado, en comparación con su abundancia en los cerdos que permanecieron en condiciones termoneutrales ( $P = 0.047$ ). Al comparar la abundancia relativa de ADN de esta especie en cerdos en estrés por calor que recibieron el probiótico, ésta también fue menor, y representó únicamente el 44% de la abundancia observada en los cerdos en condiciones termoneutrales alimentados con la dieta base ( $P = 0.023$ ).

A pesar de su alta variación entre los cerdos, la abundancia relativa de ADN de microorganismos de la especie de *Escherichia coli* en intestino delgado tendió a incrementarse 170% aproximadamente, cuando los cerdos se encontraron en condiciones de estrés por calor recibiendo la dieta base, en comparación con los cerdos que se mantuvieron en condición termoneutral ( $P = 0.086$ ). Sin embargo, la suplementación con el probiótico a los cerdos en estrés por calor no redujo la abundancia relativa de ADN de esta especie a

niveles cercanos a los observados en los cerdos en condición termoneutral ( $P = 0.284$ ).

El estrés por calor incrementó seis veces la abundancia de ADN de *Bacillus* sp. ( $P < 0.001$ ) en comparación con los cerdos que se encontraban en termoneutralidad. Además, de acuerdo con el diseño del experimento, la suplementación con el probiótico a cerdos en estrés por calor también incrementó por más de 15 veces la abundancia de ADN de este género bacteriano en el intestino de los cerdos en comparación con los cerdos mantenidos en condición termoneutral ( $P < 0.001$ ); así también su abundancia fue 2.5 veces mayor a la observada en los cerdos en estrés por calor que recibieron la dieta base ( $P = 0.006$ ).

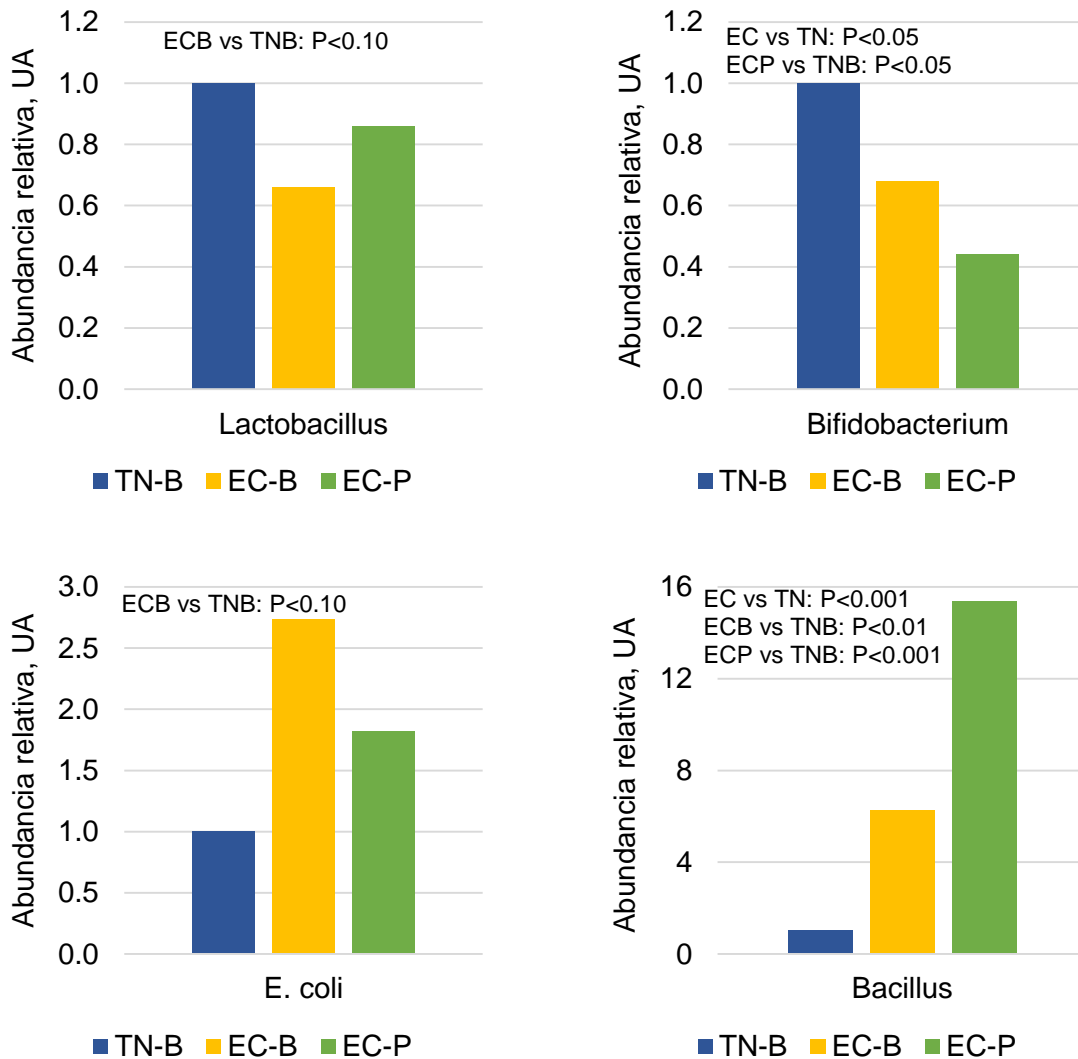


Figura 2. Cambios relativos en la población de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *E. coli*, y *Bacillus* en intestino de cerdos alimentados con una dieta adicionada con un probiótico a base de *Bacillus subtilis*. (Abundancia de ADN específico de cada organismo en relación al ADN de bacterias totales analizado por qPCR).

## X. DISCUSIÓN

Actualmente la producción porcina presenta desafíos importantes, debido a la influencia de múltiples factores en su eficiencia productiva, tales como alimentación, género, raza, temporada y otros factores que pueden estresar a los animales (Cross et al., 2020). Se ha mencionado que las condiciones ambientales como las que ocurren en ciertas regiones del mundo durante el verano, cuando la temperatura ambiental supera la temperatura de confort de los cerdos, puede observarse reducción en el consumo de alimento y parámetros productivos de los animales, así como también en su fisiología (Collin et al., 2001).

En consecuencia, en este instituto se observó en estudios previos que dependiendo de la temperatura ambiente, la temperatura intestinal de cerdos criados en condiciones de estrés por calor se puede incrementar hasta 2.0 °C (Morales et al., 2013). Lo anterior podría afectar directamente la microbiota intestinal de los cerdos (Cervantes et al., 2016). Por otra parte, es conocido que para subsanar el incremento en su temperatura corporal y para favorecer la pérdida de calor, los cerdos desvían su circulación sanguínea hacia tejidos periféricos como la piel, lo que resulta en una reducción en el aporte de oxígeno y nutrientes a intestino delgado; además, se incrementa la producción de radicales libres por las células del epitelio intestinal lo que deteriora las condiciones del epitelio (Lambert, 2004; Pearce et al., 2013). En resumen, el daño intestinal causado por el estrés por calor en cerdos comprende efectos muy variados, entre los que destacan daño a las vellosidades, estrés oxidativo, disfunción de la barrera intestinal, respuesta inflamatoria incrementada, y disbiosis de la microbiota intestinal (Xia et al., 2022).

Actualmente, se están explorando diversas alternativas para contrarrestar los efectos nocivos del estrés por calor en la salud y bienestar de los animales en producción. Entre estas alternativas se menciona que los probióticos tienen múltiples efectos benéficos para los organismos que los consumen, uno de ellos es su capacidad para favorecer la diversidad y el crecimiento de microorganismos benéficos en el tracto gastrointestinal (Cho et al., 2011). Por lo anterior, la propuesta de este trabajo fue suplementar la dieta de cerdos en crecimiento en condiciones de estrés por calor con un probiótico de *Bacillus sp.*, y verificar si éste tiene algún efecto sobre la microbiota intestinal, particularmente en la población de *E. coli*, *Bifidobacterium sp.* y *Lactobacillus sp.* en intestino delgado.

En el presente estudio se observó que la abundancia relativa de *Lactobacillus* se redujo en los cerdos que fueron mantenidos en condiciones de estrés por calor, pero que tras la adición del probiótico a la dieta, la abundancia relativa de este microorganismo no fue diferente a la abundancia relativa que tenían los cerdos cuando se alojaron en condiciones termoneutrales. En consecuencia, podemos recordar algunos resultados de trabajos en donde se demuestra el beneficio de incrementar la población de *Lactobacillus* en intestino. Por ejemplo, Shin et al. (2019) realizaron un estudio en el que utilizaron un probiótico a base de *Lactobacillus plantarum* en cerditos destetados, y observaron que este probiótico tenía un efecto importante incrementando la diversidad de la microbiota intestinal; y que ello se asocia con una menor inflamación de intestino delgado, además de que promovió una más rápida la madurez del intestino en lechones al destete. En otro estudio en donde utilizaron *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* encontraron que la combinación de ambos microorganismos mejoraba el comportamiento productivo de los cerdos destetados, redujo la incidencia de diarreas y atenuaba el daño a vellosidades (Xie et al., 2022). Estos son efectos benéficos que podríamos esperar en el comportamiento productivo, salud y bienestar de

los cerdos en EC tras la administración del probiótico a base de *B. subtilis*, y que pudieran seguir siendo analizados en estudios posteriores.

En otras especies se han observado resultados similares. Por ejemplo, en aves en estrés por calor a las que se suplementó con un probiótico a base de dos especies de *Bacillus* y *Lactobacillus*, presentaron un incremento en la población de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en intestino delgado (Song et al., 2014). Esos autores indicaron que la suplementación con *Bacillus* que son bacterias consumidoras de oxígeno en intestino, tienen efecto benéfico al propiciar el crecimiento de bacterias anaeróbicas benéficas (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*), lo que además crea un ambiente ácido que previene del crecimiento de patógenos oportunistas (Rodríguez-Cabezas et al., 2010).

Por otra parte, en el presente estudio también se observó una reducción en la abundancia relativa de microorganismos del género *Bifidobacterium* en los cerdos en estrés por calor comparados con los cerdos que permanecieron en condiciones termoneutrales. La abundancia de microorganismos de esta especie también fue menor en los animales que en estrés por calor recibieron la dieta enriquecida con el probiótico. Comparando estos resultados con trabajos anteriores llevados a cabo en el ICA, Brassea (2018) no observó cambio en la abundancia de *Bifidobacterium* en contenido intestinal (yeyuno e íleon) de cerditos en destete bajo condiciones termoneutrales utilizando como probiótico una cepa nativa de *B. subtilis*. Sin embargo, en cerdos en crecimiento criados en estrés por calor, Suárez (2018) observó una tendencia a incrementar la población de *Bifidobacterium*, cuando se adicionaba la cepa nativa de *B. subtilis* a la dieta de los animales. En ese último caso, aunque no mejoraron los parámetros productivos de los cerdos, sí se observó una mejora en la altura de vellosidades intestinales, que fue asociado parcialmente al incremento de microorganismos benéficos (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) y control del crecimiento de bacterias nocivas (*E. coli*) en el intestino de los cerdos a consecuencia de la administración del probiótico. Es muy probable



tras las condiciones de estrés por calor y la administración del probiótico ocurrieran cambios en la interacción de los microorganismos en el intestino de los cerdos, específicamente con bifidobacterias, las cuales podrían deberse a la cepa específica de probiótico utilizada, a la presencia o ausencia de otros microorganismos, así como a otras condiciones de manejo que aún no han sido analizadas.

En relación a la abundancia relativa de *E. coli* en el contenido intestinal de los cerdos en estrés por calor del presente estudio, se observó que éstos incrementaron 2.5 veces la abundancia de esta especie en intestino; pero que tras la adición del probiótico la abundancia de *E. coli* se redujo y fue similar a la observada en los cerdos en condiciones termoneutrales. Como se mencionó, otros trabajos en el ICA demostraron una reducción en la población relativa de *E. coli* en intestino delgado cuando cerdos en estrés por calor fueron suplementados con *B. subtilis* (Brassea, 2018; Suárez, 2018). Anteriormente también se había indicado que uno de los beneficios del uso de probióticos en la alimentación de cerdos es su capacidad para reducir la abundancia de *E. coli* en intestino, especialmente de cepas enterotoxigénicas, es decir, aquellas con capacidad de provocar diarreas (Dubreuil, 2017; Lan et al., 2017). Lo anterior es de primordial importancia en animales sujetos a estrés, y en este estudio podría asociarse a una mayor capacidad de los cerdos en estrés por calor para responder efectivamente ante agentes patógenos y otros factores adversos.

Finalmente, es de esperar que los efectos positivos observados en la microbiota intestinal de los cerdos en estrés por calor del presente estudio tras la administración del probiótico a base de *B. subtilis*, hayan tenido repercusiones importantes en la homeostasis intestinal tanto a nivel de mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, reducción de la respuesta inflamatoria, e incremento en el consumo de alimento, absorción de nutrientes, y eficiencia productiva de los cerdos; tal como varios autores han

descrito para el uso de probióticos (El Hage et al., 2017; Mun et al., 2021; Ali et al., 2023). Sin embargo, aún se requieren más estudios que permitan explorar si el uso de éste u otros probióticos podrían tener más efectos importantes en la producción y bienestar de cerdos expuestos a condiciones de estrés por calor.

## XI. CONCLUSION

La adición de un probiótico a base de *Bacillus subtilis* a la dieta de cerdos en crecimiento criados en condiciones de estrés por calor, modifica la abundancia de los microorganismos *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, en el intestino delgado, y pudiera asociarse con efectos benéficos en la salud intestinal, absorción de nutrientes y parámetros productivos de los cerdos.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, D.L. (2021). Respuesta productiva del cerdo de engorde (*Sus scrofa*) alimentado con dietas alternativas. Tesis de la Universidad Estatal del Sur de Manabí Facultad de Ciencias Naturales y Agricultura.
- Adair, E.R., Black, D.R. (2003). Thermoregulatory Responses to RF Energy Absorption. *Bioelectromagnetics*, 24(6), 17–38.
- 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*. 51, 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.
- Ali, M. S., Lee, E. B., Hsu, W. H., Suk, K., Sayem, S. A. J., Ullah, H. M. A., Lee, S. J., & Park, S. C. (2023). Probiotics and Postbiotics as an Alternative to Antibiotics: An Emphasis on Pigs. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(7), 874.
- Barba-Vidal, E., Martín-Orúe, S. M., Castillejos, L. (2019). Practical aspects of the use of probiotics in pig production: A review. *Livestock Science*, 223, 84-96.
- Barboza, L.O. (2013). La biología tropical como método de injerencia en la soberanía nacional de los recursos naturales. *Rebelión: Ecología Social*. Página web: <http://www.rebelion.org/noticia.php?id=171107>.

- Baumgard, L.H., Rhoads, R.P., Rhoads, M.L., Gablern, N.K., Ross, J.W., Keating, A.F., Boddicker, R.L., Lenka, S., Sejian, V. (2012). Impact of climate change on livestock production. In *Environmental Stress and amelioration in livestock production*. New York: Springer, pp.413-468.
- Bermudez-Brito M., Plaza-Díaz J., Muñoz-Quezada S., Gómez-Llorente C., Gil A. (2012) Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61, 160–174
- Bonales V.J., Pedraza R.O.H., Paz P.I. (2015). Competitividad internacional de las empresas mexicanas exportadoras porcícolas. *Investigación administrativa*, 44, 0-0.
- Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, Gershwin ME. (2009). Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology*, 44, 26-46
- Bortolozo F., Kira K. (2002). Probióticos. Uso de los probióticos na alimentacio de frangos de corte. File://A:/ probióticos 10. Htm.pp:1.
- Brassea López, A. (2018). Evaluación del efecto de la suplementación con bacillus subtilis sobre el comportamiento productivo y la microbiota intestinal de cerdos destetados. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California.
- Caballero M., Lozano S. (2007). Efecto invernadero, calentamiento global y cambio climático: Una perspectiva desde las ciencias de la tierra. *Revista Digital Universitaria*.
- Campion, D.S. (2013). Calidad de la carne porcina según el sistema de producción. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina
- Cervantes M., P. Castro, M. Pérez, E. Avelar, A. Morales. (2016). High ambient temperature modifies the intestinal temperature and microbiome in pigs. *Memorias de Frontiers in human microbiota symbiotic interactions*. Pp. 71.

- Cervantes, M., Antoine, D., Valle, J. A., Vásquez, N., Camacho, R. L., Bernal, H., Morales, A. (2018). Effect of feed intake level on the body temperature of pigs exposed to heat stress conditions. *Journal of Thermal Biology*, 76, 1-7.
- Cervantes, M., N. Ibarra, N. Vásquez, F. Reyes, E. Avelar, S. Espinoza, A. Morales. (2017). Serum concentrations of free amino acids in growing pigs exposed to diurnal heat stress fluctuations. *Journal of Thermal Biology*, 69, 69-75.
- Icaza Chávez ME. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*. 78, 240-248.
- Cho J.H., Zhao P.Y., Kim I.H. (2011). Probiotics as a Dietary Additive for Pigs: A Review. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 10, 2127-2134.
- Collin, A., J. Van Milgen, S. Dubois, J. Noblet. (2001). Effect of high temperature on feeding behaviour and heat production in group-housed young pigs. *British Journal of Nutrition*, 86, 63-70.
- Cota M.S.E.M. (2015). Efecto del estrés por calor en el comportamiento y expresión de transportadores de nutrientes, HSP90, leptina y grelina en cerdos en crecimiento. Tesis de doctorado. Instituto de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma de Baja California.
- Cross, A. J., Brown-Brandl, T. M., Keel, B. N., Cassady, J. P., Rohrer, G. A. (2020). Feeding behavior of grow-finish swine and the impacts of heat stress. *Translational animal science*, 4(2).
- 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, 1766–1776.
- Cutting S.M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, 28, 214-220.

- De Rouchev, J. (2014). Sistema Digestivo del Cerdo: Anatomía y Funciones. Centro de Informacion de Actividades Porcinas. Pp. 2-3.
- Dubreuil J. D. (2017). Enterotoxigenic *Escherichia coli* and probiotics in swine: what the bleep do we know? *Bioscience of microbiota, food and health*, 36, 75–90.
- El Hage, R., Hernandez-Sanabria, E., Van de Wiele, T. (2017). Emerging Trends in "Smart Probiotics": Functional Consideration for the Development of Novel Health and Industrial Applications. *Frontiers in microbiology*, 8, 1889.
- Flores L., Usca J., Peñafiel S., Tello L. (2020), Probióticos Como Aditivos Dietéticos Para Cerdos. Una Revisión. VI Congreso Internacional De La Ciencia, Tecnología, Emprendimiento E Innovación 2019, *KnE Engineering*, 477—499.
- Fuller R. (1991). Probiotics in human medicine. *Gut*, 32, 439–442.
- 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.
- Godyń, D., Herbut, P., Angrecka, S., Vieira, F. M. C. (2020). Use of different cooling methods in pig facilities to alleviate the effects of heat Stress—A review. *Animals*, 10, 1459.
- Guillot, J.F. (2000). The pross and cons of probiotics. Make probiotics work for poultry. *World Poultry* 16:18.
- Han, K. S., Balan, P., Molist Gasa, F., Boland, M. (2011). Green kiwifruit modulates the colonic microbiota in growing pigs. *Letters in applied microbiology*, 52, 379–385.
- 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), 1869–1876.

Higuera, A., García C.R., Bravo A. (2013). Las ciudades, el cambio climático y un estudio de caso en Mexicali, B.C. En: *Baja California ante el embate del cambio climático*. México. Editorial UABC, (pp. 51-75). ISBN: 978-607-607-132-8.

Horowitz, M., L. Eli-Berchoer, I. Wapinski, N. Friedman, E. Kodesh. (2004). Stress-related genomic responses during the course of heat acclimation and its association with ischemic-reperfusion cross-tolerance. *Journal of Applied Physiology*, 97, 1496-1507.

Huyhn, T., A. Aarnink, W. Gerrits, M. Heetkamp, T. Canh, H. Spoolder, B. Kemp, M. Verstegen. (2005). Thermal behaviour of growing pigs in response to high temperature and humidity. *Applied Animal Behaviour Science*, 91: 1-16.

Icaza-Chávez M.E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*. 78, 240-248.

Kayama, H., Takeda, K. (2020). Manipulation of epithelial integrity and mucosal immunity by host and microbiota-derived metabolites. *European journal of immunology*, 50, 921–931.

Kaufman P., Pfeffernkorn A., Teuber M., Meile L. (1997). Identification and quantification of Bifidobacterium species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 1268-1273.

Kenny M., Smidt H., Mengheri E., Miller B. (2011). Probiotics - do they have a role in the pig industry? *Animal*, 5, 462-470.



- Kerr, B. J., Yen, J. T., Nienaber, J. A., Easter, R. A. (2003). Influences of dietary protein level, amino acid supplementation and environmental temperature on performance, body composition, organ weights and total heat production of growing pigs. *Journal of animal science*, 81, 1998–2007.
- Lacetera, N., Bernabucci, U., Ronchi, B., Nardone, A. (2003). Physiological and productive consequences of heat stress. The case of dairy ruminants. *EAAP Technical Series*, 7, 45-60.
- Lagos, D. (2021). Respuesta productiva del cerdo de engorde (*Sus scrofa*) alimentado con dietas alternativas. Tesis de licenciatura. Universidad Estatal del Sur de Manabí.
- Lan, R., Tran, H., Kim, I. (2017). Effects of probiotic supplementation in different nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, fecal microflora and noxious gas emission in weaning pig. *Journal of the science of food and agriculture*, 97, 1335–1341.
- 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, 1463–1470.
- Lewis A.J., Southern L.L. (2000). *Swine Nutrition*, Second Edition.
- Liao, S. F., Nyachoti, M. (2017). Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Animal nutrition*, 3, 331–343.
- Livak, K., Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-DDCt}$  method. *Methods* 25, 402-408.
- Macedo, M. (2016). Efecto del butirato de sodio en el comportamiento productivo de cerdos en fase de iniciación. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México centro Universitario UAEM Temascaltepec.

- Milián G., Pérez M., Bocourt R. (2008) Empleo de probióticos basado en *Bacillus sp* y de sus endosporas en la producción avícola. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 42, 2.
- Morales A., Cota M., Arce N., Castillo G., Cervantes M., Araiza A. (2013). Effect of heat stress on body temperature, respiratory frequency and performance of pigs. FASEB Experimental Biology. Boston MA. USA.
- Morales, A., M. Cota, N. Ibarra, N. Arce, J. Htoo, M. Cervantes. (2016). Effect of heat stress on the serum concentrations of free amino acids and some of their metabolites in growing pigs. Journal of Animal Science, 94: 2835-2842.
- Morales, A., González, F., Bernal, H., Camacho, R. L., Arce, N., Vásquez, N., González-Vega, J. C., Htoo, J. K., Viana, M. T., Cervantes, M. (2021). Effect of arginine supplementation on the morphology and function of intestinal epithelia and serum concentrations of amino acids in pigs exposed to heat stress. Journal of animal science, 99, skab179.
- Morales, A., Sánchez, V., Pérez, B., Camacho, R. L., Arce, N., Avelar, E., González-Vega, J. C., Htoo, J. K., Cervantes, M. (2023). Effect of dl-methionine supplementation above requirement on performance; intestinal morphology, antioxidant activity, and gene expression; and serum concentration of amino acids in heat stressed pigs. Journal of animal science, 101, skac379.
- Moran, E. (2018). Anatomofisiología del tracto digestivo de aves y cerdos y a influencia de los alimentos. Proceedings Sponsors Revista avi-News.
- Moseley P.L., Gisolfi, C.V. (1993). New frontiers in thermoregulation and exercise. Sports Medicine, 16, 163–167.
- Mun, D., Kyoung, H., Kong, M., Ryu, S., Jang, K. B., Baek, J., Park, K. I., Song, M., Kim, Y. (2021). Effects of Bacillus-based probiotics on growth

performance, nutrient digestibility, and intestinal health of weaned pigs. *Journal of animal science and technology*, 63(6), 1314–1327.

Muñoz R.G. (2018). Modelo de empresarialidad rural para la producción porcina del estado de Baja California. México. Universidad Autónoma de Baja California. 1ª. Edición.

NOM-062-ZOO-1999. (2001). In Ochoa, M. L. I. (Ed.), Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación.

NRC. (2012). Nutrient Requirements of Swine (11th rev. ed.). National Academy Press.

Pardio V.T., Krzysatof N., Waliszewski K.N., Robledo G. (1994). Los probióticos y su futuro. *Arch Latinoam Nutr.* 4681:6-10.

Pearce, S.C., Mani V., Weber T.E., Rhoads R.P., Patience J.F., Baumgard L.H., Gabler N.K. (2013). Heat stress and reduced plane of nutrition decreases intestinal integrity and function in pigs. *Journal of Animal Science*, 91, 5183–5193.

Pearce, S. C., Sanz Fernandez, M. V., Torrison, J., Wilson, M. E., Baumgard, L. H., Gabler, N. K. (2015). Dietary organic zinc attenuates heat stress-induced changes in pig intestinal integrity and metabolism. *Journal of animal science*, 93, 4702–4713.

Penna FJ. (1998). Diarrea y probióticos. Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. *Revista de Enfermedades Infecciosas Pediátricas*, XI, 182.

Prosser C., Stelwagen K., Cummins R., Guerin P., Gill N., Milne C. (2004). Reduction in heat-induced gastrointestinal hyperpermeability in rats by bovine colostrums and goat milk powders. *Journal of Applied Physiology* 96, 650–654.

- Quintero, N. M. (2013). Baja California ante el embate del cambio climático. México. Editorial UABC.
- Renaudeau, D., C. Anais, L. Tel, J. Gourdine. (2010). Effect of temperature on thermal acclimation in growing pigs estimated using a nonlinear function. *Journal of Animal Science*, 88, 3715-3724.
- Resta-Lenert, S., Barrett, K. E. (2006). Probiotics and commensals reverse TNF-alpha- and IFN-gamma-induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 130, 731–746.
- Rezende, E.L., Bacigalupe, L.D. (2015). Thermoregulation in endotherms: physiological principles and ecological consequences. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 185, 709–727.
- Riechmann y Calatayud., (2013) Empleo de probióticos y prebióticos en pediatría. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 1.
- Rodríguez-Cabezas, M. E., D. Camuesco, B. Arribas, N. Garrido- Mesa, M. Comalada, E. Bailon, M. Cueto-Sola, P. Utrilla, E. Guerra-Hernandez, C. Perez-Roca, J. Galvez, A. Zarzuelo. (2010). The combination of fructooligosaccharides and resistant starch shows prebiotic additive effects in rats. *Clinical Nutrition*, 29, 832–839.
- Rothfusz, L. (1990). The Heat Index "Equation" (or, More than you ever wanted to know about Heat Index). Scientific Services Division NWS Southern Region Headquarters. Technical Attachment. Fort Worth, TX.
- Sanders M. E. (2003). Probiotics: considerations for human health. *Nutrition reviews*, 61, 91–99.

- 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.
- Sanz Fernandez, M. V., Pearce, S. C., Gabler, N. K., Patience, J. F., Wilson, M. E., Socha, M. T., Torrison, J. L., Rhoads, R. P., Baumgard, L. H. (2014). Effects of supplemental zinc amino acid complex on gut integrity in heat-stressed growing pigs. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 8, 43–50.
- Sauer, W. C., Jørgensen, H., Berzins, R. (1983). A modified nylon bag technique for determining apparent digestibilities of protein in feedstuffs for pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 63, 233–237.
- Seneviratne R, Beltranena W. E, Newkirk R. W, Goonewardene L. A, Zijlstra R. T. (2011). Processing conditions affect nutrient digestibility of cold-pressed.
- Shin, D., Chang, S. Y., Bogere, P., Won, K., Choi, J. Y., Choi, Y. J., Lee, H. K., Hur, J., Park, B. Y., Kim, Y., Heo, J. (2019). Beneficial roles of probiotics on the modulation of gut microbiota and immune response in pigs. *PloS one*, 14, e0220843.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2022). Escenario mensual de productos agroalimentarios. Carne de porcino. Dirección de Análisis Estratégico. 13 de junio. SADER, México.
- SIAP, Sistema de información agroalimentaria y pesquera (SIAP, 2021) Atlas Agroalimentario 2021 Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Página web, [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021).

- Solorzano V. A. I. (2020). Alternativas alimenticias locales y su incidencia en el microbiota del tracto gastro intestinal en cerdos de ceba. Tesis de licenciatura. Universidad Estatal del Sur de Manabi. Facultad de Ciencias de la Agricultura. Página web, <http://repositorio.unesum.edu.ec/handle/53000/2737>
- Song J., Xiao K., Ke Y. L., Jiao L.F., Hu C.H., Diao Q.Y., Shi B., Zou X.T. (2014). Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Poultry Science*, 93, 581–588.
- Steadman, R.G. (1979). The assessment of sultriness. Part I: A temperature-humidity index based on human physiology and clothing science. *Journal of Applied Meteorology*, 18, 861–873.
- Suárez R.A. (2018). Evaluación de *Bacillus subtilis* de intestino delgado de cerdos para contrarrestar los efectos del estrés por calor. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Baja California.
- Varedi M., Chinery R., Greeley G.H., Herndon D.N., Englander E.W. (2001). Thermal injury effects on intestinal crypt cell proliferation and death are cell position dependent. *American Journal of Physiology*, 280G, 157–163.
- Willing BP, Malik G, van Kessel AG. (2012). Nutrition and gut health in swine. In: Chiba LI, editor. *Sustainable swine nutrition*. Chichester: Wiley. Pp. 197–213.
- Wilson T., Crandall C. (2011). Effect of thermal stress on cardiac function. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 39, 12–17.
- Xia, B., Wu, W., Fang, W., Wen, X., Xie, J., Zhang, H. (2022). Heat stress-induced mucosal barrier dysfunction is potentially associated with gut microbiota dysbiosis in pigs. *Animal nutrition (Zhongguo xu mu shou yi xue hui)*, 8, 289–299.

- Xie, Z., Li, M., Qian, M., Yang, Z., Han, X. (2022). Co-Cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus subtilis* Enhance Mucosal Barrier by Modulating Gut Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids. *Nutrients*, 14, 4475.
- Yirga H. (2015). The use of probiotics en animal nutrition. *Journal of Probiotics and Health*. 3, 132.
- Yu, J., Yin, P., Liu, F., Cheng, G., Guo, K., Lu, A., Zhu, X., Luan, W., Xu, J. (2010). Effect of heat stress on the porcine small intestine: A morphological and Gene expression study. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 156, 119–128.
- Zheng, D., Liwinski, T., Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell research*, 30, 492–506.