

Efecto de *Lactobacillus salivarius* sobre la microbiota intestinal, el estado sanitario y el desempeño productivo de cerdos en etapa de recría

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,
Área Producción Animal*

Constanza Laura Stoppani

Ingeniera Agrónoma - Universidad Nacional de Rosario- 2013

Estación Experimental Agropecuaria Pergamino (INTA)



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Director de Tesis

Lorena Paola Soto

Lic. en Biotecnología (Universidad Nacional del Litoral)

Dra. en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Litoral)

Co-director de Tesis

Verónica Mariel Rocha

Ing. Zootecnista (Universidad Nacional de Lomas de Zamora)

Máster en Sanidad y Producción Porcina (Universitat de Lleida)

Consejero de Estudios

Patricia Silvia Silva

Ingeniera Agrónoma (Universidad Nacional de Rosario)

Magister en Salud y producción Porcina (Universidad Nacional de Río Cuarto)

JURADO DE TESIS

JURADO

Fernando Anibal Bessone

Médico Veterinario (Universidad Nacional De Río Cuarto)

Magister en Salud Animal (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

María Teresita Benzzo

Bioquímica (Universidad Nacional del Litoral)

Magister en Ciencias y Tecnología de los Alimentos (Universidad Nacional del Litoral)

JURADO

Jesica Evelyn Blajman

Médica Veterinaria (Universidad Nacional del Litoral)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Litoral)

Fecha de defensa de la tesis: 09 de noviembre de 2023

Dedicatoria

A Ale y Mati, por ser mi sostén y mi guía. Por acompañarme en esta aventura y recordarme siempre que puedo lograrlo.

A mis padres y mis hermanos, por alentarme siempre a seguir adelante.

Agradecimientos

A mi directora de tesis Lorena Soto, por guiarme con tanta paciencia y por compartir sus conocimientos.

A mi codirectora, Verónica Rocha, por asumir el desafío aún sin ser especialista en el tema.

A Patricia Silva, consejera de tesis, docente y amiga, por guiarme y alentarme siempre a seguir adelante.

Al equipo de trabajo de porcinos de INTA Pergamino, en especial a mi compañera y amiga María, por tener siempre la palabra justa.

A Beto Zimmermann por la paciencia y la dedicación para enseñarme y colaborar con la obtención de resultados, sin su aporte habría sido muy difícil finalizar esta tesis.

A Marcia Fusari, Laureano Frizzo, Melisa Saluzzo, Carolina Olivero y todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Análisis de Alimentos del Instituto de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, por colaborar en la realización de la etapa experimental y por recibirme con tanta calidez en su lugar de trabajo para procesar muestras.

A mi querida tía Alejandra Martínez y todo el equipo del Servicio de Histotecnología del Área Morfología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacia de la Universidad Nacional de Rosario.

A Andrés Lavore, del Centro de Bioinvestigaciones de la Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme el uso de sus equipos para el análisis de imágenes.

A María José Beribe, por estar siempre dispuesta a conectarse, por su paciencia y dedicación para enseñarme. Por sus aportes para realizar los análisis estadísticos y escribir los resultados con claridad.

A Lorena Roldán, por su compromiso para poder llevar a cabo el experimento.

A mi querida tía, María Julia Farruggia, por su dedicación y aporte para que esta tesis tenga una lectura más amena.

A la institución, INTA, por brindarme la posibilidad de seguir formándome.

Declaración

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Constanza Laura Stoppani

Publicaciones derivadas de la tesis

“Administración de *Lactobacillus salivarius* DSPV014C y modulación de la microbiota intestinal en cerdos de recría”. 2020. **Stoppani C.**, Suarez del Cerro, M., Beribe, M.J., Zimmermann, J.A., Frizzo, L.S., Soto, L.P. Jornada “Inocuidad en Producción Porcina: Enfoque desde el concepto de Una Salud” de las Jornadas Temáticas Específicas 2020, organizadas por División Alimentos Medicamentos y Cosméticos y Filial Córdoba de la Asociación Argentina de Microbiología.

“Efecto de *Lactobacillus salivarius* DSPV 014C sobre la morfología intestinal de cerdos en etapa de recría”. 2021. **Stoppani, C.**, Suarez del Cerro, M., Beribe, M.J., Roldán, L., Zimmerman, J.A., Soto, L.P. IX Jornada de Difusión de la Investigación y Extensión de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNL.

"Efecto de *Lactobacillus salivarius* DSPV014C sobre el desempeño productivo de cerdos en etapa de recría" 2020. **Stoppani, C.**, Suarez del Cerro, M., Beribe, M.J., Zimmermann, J.A., Frizzo, L.S., Soto, L.P., Silva, P., Roldán, M.L. En Congreso Argentino de Nutrición Animal. Revista Agroindustria n° 154 pp 16:18.

ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Producción porcina internacional y nacional.....	2
1.2	Uso de antimicrobianos en la producción animal	3
1.3	Alternativa al uso de antimicrobianos: probióticos.....	5
1.4	<i>Lactobacillus salivarius</i> DSPV014C	7
1.5	Hipótesis	8
1.6	Objetivo general.....	8
1.7	Objetivos específicos	8
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.1	Ensayo <i>in vivo</i> con cerdos	10
2.2	Marcación y producción del probiótico.....	11
2.3	Diseño experimental.....	12
2.4	Medición de variables	14
2.4.1	Microbiota.....	14
2.4.1.1	Recuento de poblaciones microbianas	14
2.4.1.2	Dinámica poblacional de la microbiota predominante	16
2.4.1.2.1	Extracción de ADN genómico presente en la materia fecal	16
2.4.1.2.2	Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	16
2.4.1.2.3	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)	17
2.4.2	Score fecal.....	18
2.4.3	Análisis en sangre	19
2.4.3.1	Eritrograma y leucograma	19
2.4.3.2	Bioquímica sanguínea	20
2.4.4	Morfología intestinal.....	20
2.4.5	Indicadores productivos	21
2.5	Análisis estadístico	22
3.	RESULTADOS	24
3.1	Microbiota	25
3.1.1	Recuento de poblaciones microbianas	25

3.1.2	Dinámica poblacional de la microbiota predominante	27
3.1.2.1	Perfil obtenido a partir de la DGGE.....	27
3.1.2.2	Caracterización taxonómica de la microbiota presente en la materia fecal	31
3.2	Score fecal	35
3.3	Análisis en sangre.....	36
3.3.1	Eritrograma y leucograma.....	36
3.3.2	Bioquímica sanguínea	40
3.4	Indicadores productivos.....	42
3.5	Morfología intestinal.....	44
4	DISCUSIÓN.....	46
4.1	Microbiota	47
4.1.1	Recuento de poblaciones microbianas	47
4.1.2	Dinámica poblacional de la microbiota predominante	49
4.1.2.1	Perfil obtenido a partir de la DGGE.....	49
4.1.2.2	Caracterización taxonómica de la microbiota presente en la materia fecal	50
4.2	Score fecal	52
4.3	Análisis en sangre.....	53
4.3.1	Eritrograma y leucograma.....	53
4.3.2	Bioquímica sanguínea	55
4.4	Indicadores productivos.....	56
4.5	Morfología intestinal.....	57
5	CONCLUSIONES GENERALES	59
6	BIBLIOGRAFÍA	61

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Aporte nutricional de cada fase de alimentación.....	11
Cuadro 2. Liófilo de <i>L. salivarius</i> entregado por animal durante todas las semanas del experimento.....	14
Cuadro 3. Condiciones de incubación para el recuento de especies microbianas.....	15
Cuadro 4. Secuencia de primers utilizados para amplificar el ADN bacteriano presente en la materia fecal de los cerdos.	17
Cuadro 5. Programa utilizado para la amplificación por PCR de la región codificante del gen 16S del ADNr.....	17
Cuadro 6. Recuento semanal de poblaciones microbianas expresado en log de las UFC por gramo de materia fecal (log UFC/gr MF)	26
Cuadro 7. Relaciones entre poblaciones microbianas muestreadas en materia fecal de lechones.....	27
Cuadro 8. Índices de diversidad, homogeneidad y riqueza del microbioma de la materia fecal de cerdos en etapa de recría.....	31
Cuadro 9. Porcentaje de identidad de secuencias parciales del gen 16S ARNr presente en la materia fecal de lechones en la semana 0, comparadas con las secuencias presentes en la base de datos del NCBI.....	33
Cuadro 10. Porcentaje de identidad de secuencias parciales del gen 16S ARNr presente en la materia fecal de lechones en la semana 3, comparadas con las secuencias presentes en la base de datos del NCBI	34
Cuadro 11. Porcentaje de identidad de secuencias parciales del gen 16S ARNr presente en la materia fecal de lechones en la semana 6, comparadas con las secuencias presentes en la base de datos del NCBI	34
Cuadro 12. Distribución de frecuencias relativas del score fecal para cada grupo	35
Cuadro 13. Consumo medio diario y ganancia media diaria para el GP y GC en cada semana del estudio	43
Cuadro 14. Conversión alimenticia para GC y GP.....	43
Cuadro 15. Altura de vellosidades y profundidad de criptas en intestino delgado de lechones al finalizar la etapa de recría	45

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Galpón de ensayos sección Porcinos, EEA INTA Pergamino.....	10
Figura 2. Disposición de los grupos en las jaulas experimentales dentro del galpón.....	13
Figura 3. Suministro de Lactobacillus salivarius DSPV014C a lechones en etapa de recría.	13
Figura 4. Dendrograma de los perfiles DGGE de la microbiota predominante en la materia fecal de los cerdos en la semana 0.....	28
Figura 5. Dendrograma de los perfiles DGGE de la microbiota predominante en la materia fecal de los cerdos en la semana 3.....	28
Figura 6. Dendrograma de los perfiles DGGE de la microbiota predominante en la materia fecal de los cerdos en la semana 6.....	29
Figura 7. Dendrograma de los perfiles DGGE de la microbiota predominante en la materia fecal de los cerdos del Grupo Control para las semanas 0, 3 y 6.....	30
Figura 8. Dendrograma de los perfiles DGGE de la microbiota predominante en la materia fecal de los cerdos del Grupo Probiótico para las semanas 0, 3 y 6.....	30
Figura 9. Distribución porcentual de A: phylum, B: clases (dentro de Firmicutes), C: órdenes (dentro de Clostridia) y D: familias (dentro de Clostridiales) encontrados en la materia fecal de cerdos en etapa de recría.....	32
Figura 10. Número de observaciones según score fecal y tratamiento en cada semana para el grupo control (GC) y el grupo probiótico (GP).....	35
Figura 11. Evolución semanal de parámetros sanguíneos obtenidos del eritrograma para cerdos del grupo control (GC) y grupo probiótico (GP).	38
Figura 12. Evolución semanal de parámetros sanguíneos obtenidos del leucograma para cerdos del grupo control (GC) y grupo probiótico (GP).	39
Figura 13. Evolución semanal de parámetros sanguíneos obtenidos del leucograma para cerdos del grupo control (GC) y grupo probiótico (GP).	41
Figura 14. Evolución semanal de los niveles de calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, triglicéridos y colesterol en sangre de cerdos del grupo control (GC) y grupo probiótico (GP).	42
Figura 15. Evolución semanal del peso vivo promedio (\pm error estándar) por unidad experimental.....	43

Figura 16. Consumo de alimento total y total de kilogramos ganados por jaula en todo el período experimental. GC: grupo control. GP: grupo probiótico.44

ABREVIATURAS Y SIGLAS

APC: antibióticos promotores de crecimiento

ATM: antimicrobianos

BAL: bacterias ácido lácticas

BSH: enzima hidrolasa de sales biliares

C: profundidad de criptas

CA: conversión alimenticia

CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media

CMG: consumo medio diario

DGGE: del inglés: “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”; electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante

FLA: fórmula leucocitaria absoluta

FLR: fórmula leucocitaria relativa

GB: glóbulos blancos

GC: grupo control

GMD: ganancia media diaria

GP: grupo probiótico

GR: glóbulos rojos

HCM: hemoglobina corpuscular media

Hgb: hemoglobina

Hto: hematocrito

Índice N/L: relación entre neutrófilos y linfocitos

KCl: cloruro de potasio

KH₂PO₄: Fosfato monopotásico

LAMVAB: Medio Lactobacillus Anaerobic MRS con vancomycina y verde de bromocresol

MN: células mononucleares

MO: microorganismos

MRS: Medio de Man, Rogosa y Sharpe

Mt: millones de toneladas

Na₂HPO₄: fosfato de disodio

NaCl: cloruro de sodio

Pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PMN: células polimorfonucleares

PPA: peste porcina africana

PV: peso vivo

PVf: peso vivo final

TBE: Tris Borato EDTA

TGI: tracto gastrointestinal

UE: Unión Europea

UFC: unidad formadora de colonias

V/C: relación entre altura de vellosidades y profundidad de criptas

V: altura de vellosidades

VCM: volumen corpuscular medio

RESUMEN

El normal funcionamiento del tracto gastrointestinal es crucial para los procesos fisiológicos y metabólicos de los cerdos, dependiendo ampliamente de la microbiota presente. El estrés del destete altera dicha microbiota, generando desórdenes fisiológicos y metabólicos, afectando indicadores productivos. Dada la creciente restricción de antibióticos, para contrarrestar estos efectos, se estudian los probióticos como una alternativa viable a este problema. El objetivo de este trabajo fue evaluar cambios en la microbiota intestinal, parámetros productivos y sanitarios en cerdos en recría al suplementar *Lactobacillus salivarius* DSPV014C. Para ello, se realizó un estudio con 20 lechones en dos grupos, GP: suplementando *L. salivarius* y GC: sin suplemento. Durante 6 semanas se muestreó materia fecal para evaluar poblaciones microbianas y determinar la dinámica poblacional de la microbiota predominante. Además, se calcularon índices de diversidad, homogeneidad y riqueza. Semanalmente, se determinaron aumento medio diario, consumo medio diario y conversión alimenticia (CA); y a través de análisis de sangre se evaluaron hemograma y concentración de indicadores sanguíneos. Finalizado el estudio se muestreó el intestino para evaluar altura de vellosidades (V), profundidad de criptas (C) y su relación V/C. En el GP, *L. salivarius* fue recuperado desde la semana 1, demostrando su capacidad de alcanzar el intestino. La modulación de la microbiota difirió, viéndose un perfil distinto entre grupos al finalizar el estudio y los índices de diversidad y riqueza presentaron mayores valores en GP. La CA fue mejor para el GP como así también los valores de V y la relación V/C. En conclusión, la suplementación con *L. salivarius* DSPV014C mejoró el desempeño productivo de los cerdos del GP, lo que se explicaría por un incremento en la capacidad de digestión y absorción dadas por una mayor longitud de vellosidades intestinales y una modulación diferencial de la microbiota intestinal, con mayores índices de riqueza y diversidad.

Palabras clave: probióticos, microbiota intestinal, conversión alimenticia, cerdos, bacterias ácido lácticas.

ABSTRACT

The proper functioning of the gastrointestinal tract (GIT) is crucial for normal physiological and metabolic functions in pigs and is largely dependent on the GIT microbiota. Weaning stress alters microbiota balance generating physiological and metabolic disorders affecting growth performance. Given the increasing restriction of the use of antibiotics to counteract these effects, probiotics are being studied as a viable alternative to this problem. In order to evaluate performance, health parameters and changes in the intestinal microbiota in weanling pigs when supplemented with *Lactobacillus salivarius* DSPV014C, a study with 20 piglets was carried out. There were two groups, GP: supplemented with *L. salivarius* and GC: without supplementation. Over 6 weeks, feces were sampled to evaluate microbial populations and determine the microbial population dynamic. In addition, diversity, homogeneity and richness indexes were calculated. Average daily gain, average daily feed intake and feed ratio (FR) were weekly determined; also, through blood tests, hemogram and concentration of blood indicators were evaluated. Once the study was completed, the intestine was sampled to evaluate height of villi (V), depth of crypts (C) and their V/C ratio. In the GP, *L. salivarius* was recovered from week 1, demonstrating its ability to reach the intestine. The modulation of the microbiota differed, and it showed different profiles between groups at the end of the study, and the diversity and richness indexes presented higher values in GP. The CA was better in GP as well as the V values and the V/C ratio. In conclusion, the supplementation with *L. salivarius* DSPV014C improved the performance of the GP pigs, which would be explained by an increase in the digestion and absorption capacity given by a greater length of intestinal villi and a differential modulation of the intestinal microbiota, with higher indexes of richness and diversity.

Key words: pigs, probiotics, intestinal microbiota, feed ratio, lactic acid bacteria.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Producción porcina internacional y nacional

A escala internacional, en el último decenio se registraron grandes cambios en el consumo de carnes, tanto en los kg per cápita como en el tipo. En este sentido, en 2019 la carne más consumida fue la de pollo, seguida por la de cerdo, luego la bovina y por último la de oveja y cabra (Whitton et al., 2021). En Argentina para el mismo período, el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca reportó que las toneladas de carne de cerdo producidas aumentaron más del doble. Esto fue traccionado principalmente por un aumento del consumo interno (en 2010 se registró un consumo per cápita de 8,06 kg vs 15,64 kg en el 2020), y en los últimos años por un incremento de las exportaciones (MAGyP, 2020).

Según el informe de perspectivas agrícolas que publica la OCDE-FAO (2022), para el 2031 la oferta mundial de carne se incrementará para cubrir la demanda, alcanzando las 377 millones de toneladas (Mt). Esta expansión estará traccionada por un aumento en el número de cabezas de ganado en conjunto con una mejora de la productividad. Se prevé que, en los próximos 10 años, el consumo mundial de carne de cerdo aumentará a 129 Mt y representará un tercio del total de carnes consumidas.

El mismo documento pronostica un aumento constante de la producción mundial de cerdo hasta el 2031, a pesar de que el brote de Peste Porcina Africana (PPA) seguirá afectando a muchos países en los primeros años de las perspectivas, se espera que para el 2023 China alcance los niveles de producción anteriores a la PPA. Sin embargo, se prevé que en la Unión Europea la producción disminuya, por un lado, por la menor demanda de importaciones por parte de China. Y por otro, porque la preocupación ambiental y el bienestar animal limitarán la demanda interna. En relación a esto, las políticas de bienestar animal establecidas en países desarrollados podrían afectar la intensificación de algunos sistemas ganaderos (en especial aves de corral y cerdos). En vista de ello la Comisión Europea presentó en mayo del 2020, en el marco del Acuerdo Verde, la estrategia “De la granja a la mesa” y la “Estrategia de biodiversidad” que, entre otros puntos, propone aumentar los objetivos de bienestar animal y reducir el uso de drogas veterinarias, principalmente antimicrobianos (ATM) (USDA-GAIN, 2021).

1.2 Uso de antimicrobianos en la producción animal

En los cerdos, el buen funcionamiento del tracto gastrointestinal (TGI) es de gran importancia para el metabolismo, la fisiología, el estatus sanitario y el desempeño productivo, en cualquiera de sus estadios de crecimiento y desarrollo (Pluske et al., 2017). El intestino es una de las principales barreras de defensa de los animales ante la presión microbiana del ambiente, especialmente ante la invasión de patógenos presentes en el lumen gastrointestinal (Veizaj-Delia & Pirushi 2012). A su vez, regula la absorción de nutrientes, agua y electrolitos (Fouhse et al., 2016).

El TGI de lechones nonatos es estéril o libre de microorganismos (MO). Al nacimiento los animales quedan expuestos a bacterias presentes en la vagina de la madre y luego a MO de las heces y el ambiente. La composición de la microbiota gastrointestinal no es estática y evoluciona constantemente a través del tiempo, dándose una sucesión de MO que culmina en una comunidad en equilibrio o “climax” (Palmer et al., 2007). Cuando la simbiosis cerdo-MO esta balanceada el TGI está saludable y funciona correctamente (Willing et al., 2012).

En las granjas de cerdos de manejo intensivo, es normal que el destete de los lechones se realice entre los 15 y 28 días de vida con el objetivo de incrementar la productividad por cerda y tener un peso uniforme a la venta (Smith et al., 2008). El destete a edades tempranas, genera un enorme estrés en los cerdos (Fouhse et al., 2016). La separación de los lechones de su madre, el cambio de ambiente, la variación de temperatura y la mezcla de distintas camadas, entre otros factores, conducen a un estrés social y ambiental. Al mismo tiempo, los animales atraviesan un estrés nutricional, ya que pasan de consumir leche materna casi exclusivamente a alimentarse de una dieta generalmente sólida y seca con una composición muy diferente. Durante los primeros días luego del destete se suele observar también una disminución del consumo, que si bien es variable en cuanto a su duración, se estima que al final de la primera semana posdestete el consumo de energía metabolizable de los lechones representa entre el 60-70 % del consumo predestete y puede llevar hasta 2 semanas alcanzar niveles de consumo de energía metabolizables similares a este último (Le Dividich & Sève, 2000). Como consecuencia de lo dicho, a las 24 horas posdestete (aproximadamente) se producen marcados cambios en la estructura y la función del intestino delgado, que pueden comprender desde una disminución en el largo de las

vellosidades, un aumento de la profundidad de las criptas, hasta una reducción en la actividad de enzimas digestivas, generando efectos perjudiciales sobre la barrera intestinal (Pluske et al., 1995; Campbell et al., 2013). Cuando las funciones de dicha barrera se alteran, aumenta la permeabilidad de las membranas a toxinas, bacterias y antígenos asociados a los alimentos que pueden atravesar el epitelio dando como resultado inflamación, mala absorción y diarreas (Campbell et al., 2013). Esto último puede verse acentuado por una perturbación de la microbiota intestinal, conduciendo frecuentemente a la proliferación de bacterias enterotoxigénicas, principalmente *Escherichia coli* (Pluske et al., 1995; Fohse et al., 2016). La combinación de todos estos efectos puede producir pérdidas de peso, disminución en la tasa de crecimiento, e inclusive ocasionar la muerte de los animales (Pluske et al., 1995; Liao & Nyachoti, 2017).

El uso de ATM ha sido parte del manejo integral de las granjas porcinas modernas desde principios de 1950 (Liao & Nyachoti, 2017). En medicina veterinaria los ATM son utilizados principalmente de dos maneras: terapéutica o profiláctica. La primera corresponde al tratamiento de determinadas enfermedades, ya sea a un animal en particular o a un lote cuando se tiene la certeza de que todos han sido expuestos al agente infeccioso. La segunda se utiliza para la prevención de enfermedades en forma individual o grupal. A este último se suma el empleo de ATM en dosis subterapéuticas como antibióticos promotores de crecimiento (APC) con el fin de estabilizar la microbiota intestinal y mejorar la productividad de cerdos en crecimiento (Errecalde, 2004; Liao & Nyachoti, 2017).

Tanto el uso indiscriminado de ATM para el tratamiento de enfermedades como así también su empleo con el propósito de optimizar la producción, proporcionan un ambiente favorable para la selección, propagación y persistencia de bacterias resistentes a ATM capaces de causar enfermedades en animales y humanos (Aarestrup, 2004).

Como consecuencia, el uso de APC en producción animal está siendo evaluado cada vez con más detalle en distintos países. Suecia fue el primer país en excluirlos en 1986, Dinamarca los suprimió en el 2000, mientras que en toda la UE se prohibieron a principios de 2006 (Maron et al., 2013). Estados Unidos, siguiendo las acciones de la UE, ha comenzado a dirigirse hacia una regulación o a la prohibición total en el uso de APC en la producción animal (Liao & Nyachoti, 2017). En Argentina en enero de 2019, el SENASA

prohibió el uso de colistina y sus sales en la preparación de alimentos para ganado (Resolución 22/2019).

El aumento de la resistencia a ATM es considerado una creciente amenaza para la salud pública mundial (Tang, 2017). En este sentido la mejor manera de enfrentar el desafío de la generación de resistencias a ATM, es a través del enfoque de “Una sola salud”, concepto que reconoce las relaciones entre las personas, los animales, las plantas y el ambiente en el que existen y realiza un análisis colaborativo, multisectorial y transdisciplinario (Swedres-Svarm, 2018).

1.3 Alternativa al uso de antimicrobianos: probióticos

Considerando todo lo dicho, el uso de probióticos surge como una alternativa profiláctica para el mantenimiento del balance microbiológico intestinal. En un trabajo conjunto entre la FAO y la OMS se define a los probióticos como “MO vivos que suministrados en cantidades adecuadas confieren beneficios en la salud del huésped” (FAO/OMS, 2001).

Para que un MO sea considerado probiótico, además de no ser patógeno, deberá ser capaz de sobrevivir al pH estomacal y a las sales biliares, poder adherirse a células del tejido objetivo, tener altas tasas de crecimiento y excretar metabolitos con efectos supresores sobre MO patógenos. A su vez deberá ser posible su cultivo en gran escala por métodos simples y reproducibles, y tendrá que permanecer estable y viable en el alimento (Wang et al., 2009; Singh et al., 2011; NRC, 2012; Yadav et al., 2016).

Los probióticos pueden dividirse en tres categorías principales: levaduras, *Bacillus* y bacterias ácido lácticas (BAL) (NRC, 2012).

Si bien, en producción porcina, se han utilizado diferentes MO como probióticos, las BAL parecieran ser las que muestran mayor aptitud (Messaoudi et al., 2013; Zimmermann et al., 2016; Dowarah et al., 2018). Muchos estudios han demostrado sus efectos positivos sobre la salud intestinal de diferentes especies animales (Corr et al., 2007; Walsh et al., 2008) y en la regulación del sistema inmune en cerdos (Zhang et al., 2011).

Diferentes autores han registrado que las BAL probióticas pueden limitar la proliferación de bacterias patógenas mediante la exclusión competitiva a través de mecanismos que incluyen la producción de sustancias inhibitorias como bacteriocinas,

etanol, diacetil, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos (ácido láctico, acético y ácidos grasos de cadena corta). Estos últimos actúan reduciendo el pH intracelular e inhibiendo el transporte activo que elimina el exceso interno de protones, aumentando el consumo de ATP y, por ende, causando el agotamiento energético de los patógenos afectados (Vieco-Saiz et al., 2019).

Los patógenos o bacterias zoonóticas más comúnmente encontrados en granjas de producción animal son *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio anguillarum*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas spp.*, y *Edwardsiella spp.* Al respecto, Messaoudi et al. reportaron en 2012 que la cepa *Lactobacillus salivarius* SMXD51 (aislada del ciego de pollos) produce un componente que inhibe el crecimiento tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas, en especial *Campylobacter jejuni*. Otro estudio indica una reducción en el recuento de *E. coli* y *Clostridia* en materia fecal (MF) cuando se suplementó con cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Pediococcus acidilactici* a cerdos en diferentes etapas de crecimiento (Dowarah et al., 2017).

Por otro lado, aproximadamente el 80 % de los estudios donde se suministró una cepa probiótica, independientemente del tipo de MO, detectaron una reducción de la incidencia de diarreas en lechones (Liao & Nyachoti, 2017). En concordancia, Thu et al. (2011) hallaron una menor incidencia de diarreas al comparar un grupo de lechones que, durante el posdestete, consumieron metabolitos provenientes de distintas cepas de *Lactobacillus plantarum* versus un control negativo.

Como consecuencia del uso de BAL como suplemento, muchos estudios reportan una mejora sobre la función e integridad de la barrera intestinal. Esto se asocia, entre otras cosas, con una mejora en la absorción del alimento ingerido y la ganancia de peso posdestete (Loh et al., 2002; Hedemann et al., 2003). Tal es el caso de cerdos suplementados con una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, los que mostraron una mayor longitud de las vellosidades intestinales respecto al grupo control (Shonyela et al., 2020).

Otros autores observaron mejoras en la conversión alimenticia (CA) por parte de cerdos que consumieron BAL (Dowarah et al., 2018). Este parámetro relaciona el alimento entregado a un animal con el cambio en su peso corporal en un tiempo determinado. Es una medición importante para juzgar el desempeño productivo de los animales y por ende

evaluar el rendimiento económico en una granja porcina (Wenk et al., 1980). Vieco-Saiz et al. (2019) reportaron en una revisión bibliográfica que las BAL probióticas pueden mejorar todo el proceso digestivo, ya sea incrementando la utilización metabólica de los nutrientes, produciendo enzimas digestivas (amilasas, quitinasas, lipasas, fitasas, proteasas) o simplemente produciendo ácidos grasos volátiles y vitaminas del complejo B, lo que tiene efectos directos sobre la CA. Sumado a lo anterior, un meta-análisis de artículos científicos publicados entre 1980 y 2015, que ponen a prueba distintas cepas probióticas en cerdos, muestra que la suplementación con BAL probióticas aumenta la ganancia media diaria (g/d) y mejora la CA de los cerdos (Zimmerman et al., 2016).

1.4 *Lactobacillus salivarius* DSPV014C

Dentro del filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae*, se encuentran los géneros *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* y *Pediococcus* (De Vos et al., 2011). Los *Lactobacillus* son bacterias caracterizadas por ser Gram positivas, no poseen motilidad, no forman esporas, son tolerantes a ácidos y producen mayoritariamente ácido láctico como producto final de la fermentación de carbohidratos (Cho et al., 2009).

Recientemente Zheng et al., (2020) propusieron reclasificar el género *Lactobacillus* en 25 nuevos géneros. Entre ellos se encuentra *Ligilactobacillus*, descrito por dichos autores como un lactobacillus con un modo de vida asociado al huésped. La mayoría de las especies de *Ligilactobacillus* fueron aisladas de animales y humanos y están adaptadas a vertebrados. Varias cepas de este género expresan ureasa, enzima considerada como una de las herramientas bacterianas para soportar la acidez gástrica del huésped. Además, se encuentran comúnmente en alimentos fermentados y son utilizadas comercialmente como cepas probióticas.

Dentro de este grupo se encuentra *Lactobacillus salivarius* (Rogosa et al., 1953) reclasificada por Zheng et al. (2020) como *Ligilactobacillus salivarius*. Esta especie ha sido aislada tanto de la boca como del TGI de humanos, gatos, hámsteres, pollos y cerdos, quedando demostrado que no está adaptada a un huésped en específico (Zheng et al., 2020).

L. salivarius DSPV014C fue aislada en el Departamento de Salud Pública Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (DSPV

FCV-UNL). A partir de un proyecto de investigación orientado a la búsqueda de bacterias con características probióticas, se aislaron de una porción de intestino de cerdo 65 cepas de BAL, de las cuales solo 14 mostraron ser potenciales candidatos. Realizadas las siguientes evaluaciones *in vitro*: pruebas de agregación (permiten inferir sobre la capacidad de las bacterias de adherirse al epitelio), autoagregación (evalúa el agrupamiento de células de la misma cepa) y coagregación (determina el agrupamiento de células bacterianas genéticamente diferentes); producción de sustancias inhibitoras y evaluaciones de crecimiento a diferentes pH y a distintas concentraciones de bilis, se determinó que la cepa de *L. salivarius* DSPV014C cumple con las características buscadas para proponerla como cepa potencialmente probiótica (Bertozzi, 2012).

1.5 Hipótesis

La suplementación con *L. salivarius* DSPV014C mejora el desempeño productivo y la sanidad de los cerdos de recría, mediante la estabilización de la microbiota del TGI, la modificación de la morfología intestinal y la disminución de la incidencia de diarreas.

1.6 Objetivo general

Evaluar el impacto de la suplementación con *L. salivarius* DSPV014C sobre la microbiota intestinal, su efecto sobre el estado sanitario y el medio interno y el desempeño productivo de cerdos en etapa de recría.

1.7 Objetivos específicos

- Analizar los cambios en la diversidad y abundancia de la microbiota intestinal en el tiempo.
- Evaluar parámetros hematológicos y las concentraciones de calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, colesterol y triglicéridos en sangre.
- Contrastar la incidencia de diarrea entre los grupos experimentales.
- Comparar la morfología intestinal de los lechones en ambos grupos experimentales.
- Determinar la influencia del probiótico sobre indicadores productivos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ensayo *in vivo* con cerdos

El estudio se realizó en la Unidad Demostrativa Porcina de la Estación Experimental INTA Pergamino (ruta 32 km 4,5, 33° 56' S -60° 33' W).

El protocolo experimental diseñado para este trabajo fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (2019/61).

Los animales se alojaron, de a pares, en jaulas con piso de slat plástico de 0,82 m², con comederos tipo tolva y chupetes de altura regulable. La temperatura ambiente se mantuvo en 24± 3° C. Para esto, cada jaula contó con una lámpara infrarroja con encendido automático por debajo de los 24° C. Además, el galpón experimental estuvo equipado con dos cañones calefactores a gas con encendido automático y cortinas laterales manuales para manejar la ventilación (Figura 1).

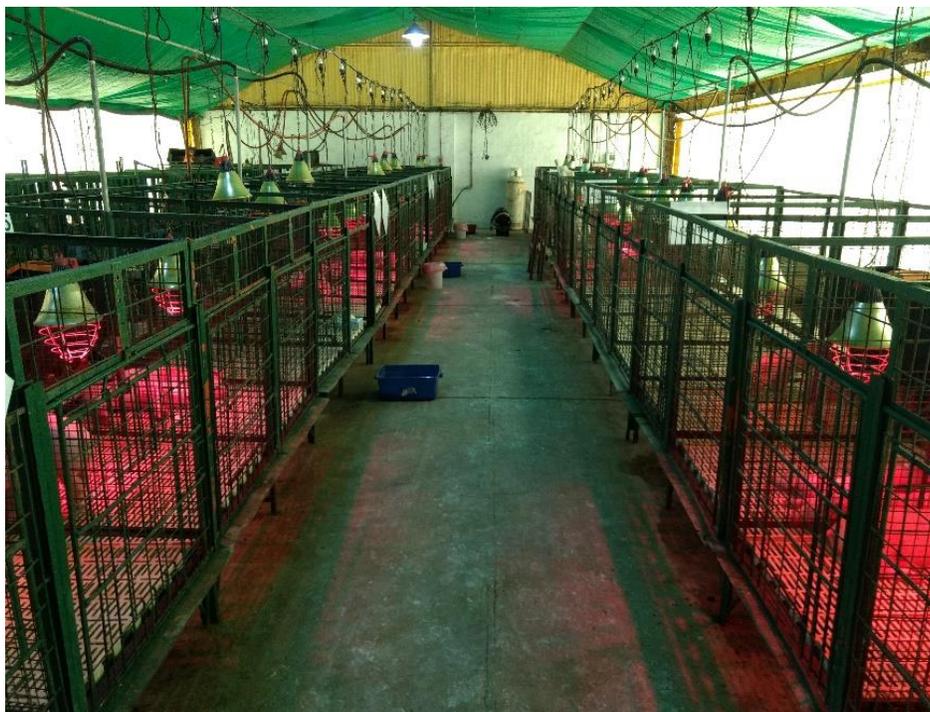


Figura 1. Galpón de ensayos sección Porcinos, EEA INTA Pergamino

Se trabajó con un total de 20 lechones (10 machos quirúrgicamente castrados y 10 hembras) de genética comercial, seleccionados del destete de 4 cerdas. El destete se realizó a los 28 días de vida promedio, en este momento todos los lechones fueron pesados

individualmente, desparasitados (0,2 cc de ivermectina) y vacunados contra circovirus y micoplasma. Los animales permanecieron en estudio durante 6 semanas, hasta finalizar la etapa de recría (70 días de vida).

Todos los animales consumieron una dieta formulada en base a maíz, harina de soja y premezcla comercial, en un programa de 3 fases alimenticias (Cuadro 1). Estas fueron ajustadas según requerimientos nutricionales (NRC 2012), los que se modifican a medida que los cerdos crecen. Todas las fases estuvieron libres de APC. El programa de alimentación se determinó según las recomendaciones comerciales de las premezclas, suministrándose por animal: 4 kg de fase 2, 13 kg de fase 3 y fase 4 desde el fin de fase 3 hasta concluir el experimento.

Cuadro 1. Aporte nutricional de cada fase de alimentación

Nutriente		Fase 2	Fase 3	Fase 4
Materia seca	%	89	90	89
Proteína cruda	%	20	20	21
EM	Kcal	3500	3306	3235
Lisina total	%	NE	1,40	1,42
Lisina digestible	%	NE	1,23	1,23
Metionina total	%	NE	0,54	0,44
Metionina digestible	%	NE	0,49	0,39
Triptófano total	%	NE	0,28	0,27
Triptófano digestible	%	NE	0,23	0,22
Treonina total	%	NE	0,96	0,94
Treonina digestible	%	NE	0,81	0,76
Valina total	%	NE	0,90	0,97
Grasa cruda	%	5,5	6,16	3,13
Fibra cruda	%	2,5	2,83	3,50
Calcio	%	0,40	0,69	0,58
Fósforo total	%	0,58	0,64	0,63
Fósforo disponible	%	NE	0,41	0,38

EM: energía metabolizable. NE: no especificado por el proveedor.

2.2 Marcación y producción del probiótico

La cepa utilizada fue *L. salivarius* DSPV014C (Número de Genbank: GQ231447). Para posibilitar su monitoreo en la MF, se produjo una mutante resistente a rifampicina. Para tal fin se hicieron cultivos seriados en el medio MRS (De Man et al., 1960) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con una concentración inicial de rifampicina de 0,1 µg/ml hasta

una concentración final de 100 µg/ml (Demecková et al., 2002; Ehrmann et al., 2002; Zimmermann, 2020).

La mutante resistente derivada del proceso se multiplicó en caldo MRS durante 24 h a 37° C (Zimmermann, 2020). A partir de este inóculo, se sembró la cepa en un biorreactor (BIOSTAT® A Sartorius). Como medio de cultivo se utilizó permeado de suero (60 g/l) suplementado con sulfato de manganeso (0,003 g/l), sulfato de magnesio (0,02 g/l), extracto de levadura (40 g/l) y Tween 80 (1 ml/l). La biomasa generada se centrifugó a 17° C durante períodos de 10 min a 5000 g (Thermo Scientific™ Sorvall™ RC 6 Plus). Finalizado este paso, se descartó el sobrenadante y el *pellet* recuperado se lavó dos veces consecutivas con solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) (NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM) (Fusari, 2020). Luego del último lavado, se desechó el sobrenadante y el *pellet* obtenido se resuspendió en 400 ml de leche descremada al 6 % (P/V), concentrando la biomasa 10X, respecto del volumen en el bioreactor. Finalmente la resuspensión se congeló a -80° C durante 24 h y se liofilizó a 0,044 mbar durante 48 h a -54° C. El liófilo se conservó a -20° C hasta su uso.

2.3 Diseño experimental

El resultado del pesaje al momento del destete dio un peso promedio de 8,95± 1,33 kg. Debido a dicha variabilidad los animales se distribuyeron en 5 bloques, siguiendo un diseño en bloques completos aleatorizados. Dentro de cada bloque, los lechones fueron asignados al azar de a pares (un macho y una hembra) a dos grupos: control (GC) y probiótico (GP), quedando constituido cada uno por 10 animales.

El peso promedio inicial para el GC fue de 8,90± 1,44 kg y para el GP de 8,99± 1,29 kg. Para corroborar que no hubiera diferencias entre grupos, se realizó una prueba T de *student* para muestras independientes ($p= 0,8848$).

Cada par de animales fue alojado en una jaula como se indica en la Figura 2, de esta manera cada jaula con dos animales determina la unidad experimental. La disposición de los grupos en el galpón no pudo hacerse en forma aleatoria debido a que fue necesario procurar una distancia mínima entre ambos para evitar la contaminación del GC con la cepa en estudio. Al mismo tiempo, para disminuir la probabilidad de contaminación se instalaron bandejas con cal a la entrada del galpón y entre grupos para la desinfección del calzado, se

utilizaron guantes descartables y se limpió con alcohol 70 % v/v todas las superficies de la ropa que pudieran haber estado en contacto con los animales.

Con el fin de suministrar una concentración diaria similar de la cepa bacteriana a cada animal, fue necesario realizar evaluaciones semanales de la viabilidad del inóculo. Para ello se realizaron recuentos en placa en medio LAMVAB con rifampicina (100 µg/ml) a 37° C en anaerobiosis, durante 96 h. En el Cuadro 2 se indican la concentración semanal del liófilo y la cantidad suministrados por cerdo. El GP recibió una dosis diaria igual o superior a 9,81 log de unidad formadora de colonias (UFC) del inóculo (nunca superó los 10,66 log UFC), con este fin el liófilo se resuspendió en agua estéril destilada y se administró a los animales oralmente con una jeringa, siempre a la misma hora (Figura 3).

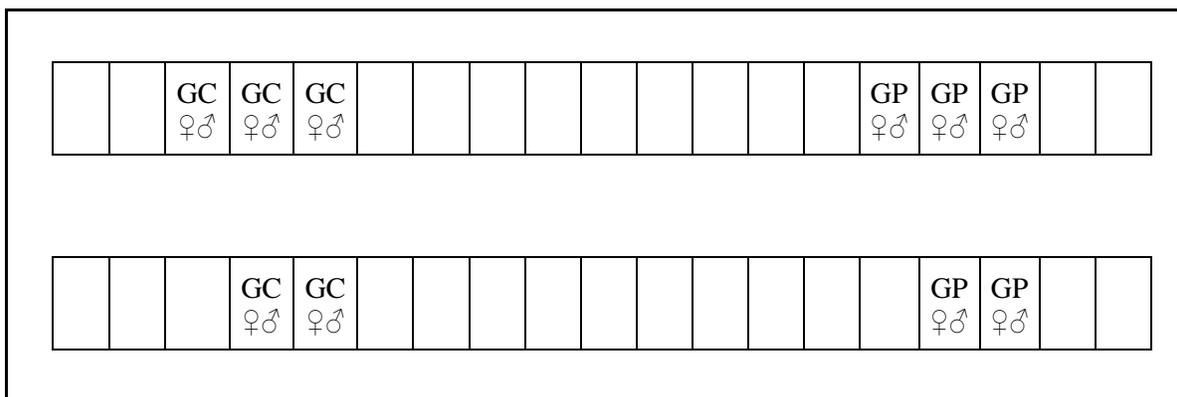


Figura 2. Disposición de los grupos en las jaulas experimentales dentro del galpón. GC: grupo control. GP: grupo probiótico.



Figura 3. Suministro de *Lactobacillus salivarius* DSPV014C a lechones en etapa de recría.

Cuadro 2. Liófilo de *L. salivarius* entregado por animal durante todas las semanas del experimento

Semana	1	2	3	4	5	6
Concentración de liófilo) (log/g	9,90	9,90	11,11	11,11	11,03	10,18
g/animal	0,99	0,99	0,90	0,96	0,96	1,00
ml/animal	5	5	5	10	10	10
log/animal	9,81	9,81	10,03	10,66	10,63	10,18

Concentración del liófilo expresado en logaritmos/gramo. g/animal: gramos del liófilo entregados por animal por día en cada semana. ml/animal: volumen final expresado en ml que se le suministró a cada animal. Log/animal: logaritmos de *L. salivarius* que recibió cada animal por día en las respectivas semanas.

2.4 Medición de variables

Las diversas muestras recolectadas durante el ensayo fueron procesadas en el Laboratorio de Análisis de Alimentos del Instituto de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (LAA-ICiVet, UNL), ubicado en la ciudad de Esperanza, Santa Fe y en la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacia de la Universidad Nacional de Rosario (FCByF-UNR).

2.4.1 Microbiota

Para realizar los análisis de la microbiota se eligieron al azar seis animales de cada grupo, a los que se les extrajo semanalmente una muestra de MF mediante masaje rectal o defecación espontánea. Las muestras se colocaron en bolsas y se mantuvieron refrigeradas, por no más de 6 h, hasta su procesamiento. La recolección fue en las semanas 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6, correspondiendo la semana 0 al comienzo del experimento, previo al inicio de la suplementación.

2.4.1.1 Recuento de poblaciones microbianas

A fin de efectuar los recuentos microbiológicos, de cada muestra de MF se tomó 1 g y se realizaron diluciones decimales seriadas en Ringer ¼ (Biokar, Beauvais, Francia) para sembrar en placas de Petri. En el Cuadro 3 se especifican los MO monitoreados, los medios de cultivo utilizados y las condiciones de incubación para cada especie (Fusari, 2020; Zimmermann, 2020).

Cumplidos los tiempos de incubación se procedió a contar las UFC. Las colonias que se suponían eran *Campylobacter* termotolerantes fueron observadas al microscopio de contraste de fases y confirmadas a partir de un fresco (Zimmermann, 2020).

Por otra parte, se calculó la relación entre los recuentos de las poblaciones de BAL y *E. coli*, *Campylobacter spp.* y levaduras. También se obtuvo la relación entre *L. salivarius* DSPV014C y BAL. A continuación, se muestran las fórmulas utilizadas para obtener cada relación:

$$\text{Relación } L.\textit{salivarius}/\text{BAL} = \frac{\text{Recuento } L.\textit{salivarius}}{\text{Recuento BAL}}$$

$$\text{Relación BAL}/E.\textit{coli} = \frac{\text{Recuento BAL}}{\text{Recuento } E.\textit{coli}}$$

$$\text{Relación BAL}/\text{Levaduras} = \frac{\text{Recuento BAL}}{\text{Recuento Levaduras}}$$

$$\text{Relación BAL}/\textit{Campylobacter spp.} = \frac{\text{Recuento BAL}}{\text{Recuento } \textit{Campylobacter spp.}}$$

Cuadro 3. Condiciones de incubación para el recuento de especies microbianas

Microorganismo	Medio de cultivo	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Condición
BAL totales	MRS	37	96	Anaerobiosis
<i>L. salivarius</i> DSPV014C	LAMVAB + rifampicina (100 µg/ml)	37	96	Anaerobiosis
<i>E. Coli</i>	TBX	44	24	Aerobiosis
<i>Campylobacter</i> termotolerantes	mCCDA	42	48	Microaerofilia
Levaduras	Cloranfenicol glucosa agar suplementado con pluripectona (5 g/l) y dextrosa (20 g/l)	37	48	Aerobiosis

BAL: bacteria ácido lácticas totales. MRS: De Man, Rogosa y Sharpe (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). LAMVAB: Lactobacillus Anaerobic MRS with Vancomycin and Bromocresol Green (Hartemink et al. 1997). TBX: Tryptone Bile X-glucuronide Agar (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). mCCDA: agar modificado con carbón vegetal, cefoperazona y deoxicolato. Microaerofilia: 85% de N₂, 10% de O₂ y 5% de CO₂.

2.4.1.2 Dinámica poblacional de la microbiota predominante

Con el objetivo de evaluar los cambios en la diversidad y abundancia de la microbiota intestinal en el tiempo, a partir de cada muestra de MF se realizó un análisis por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE del inglés: “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”). Para ello, se tomaron 0,2 g de MF, se depositaron en tubos eppendorff con 1 ml de solución PBS y se mantuvieron a -20° C hasta el procesamiento.

2.4.1.2.1 Extracción de ADN genómico presente en la materia fecal

La extracción de ADN de las muestras se realizó mediante el kit comercial Wizard® Genomic Purification DNA Kit (Promega, Madison, Estados Unidos), siguiendo las especificaciones para aislamiento de ADN genómico de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Luego del aislamiento, se cuantificó la concentración de ADN en cada muestra utilizando el equipo Take3 y software Gen5 para Windows versión 2.01 en un lector multimodal de microplacas (Sinergy HT, Bio-Tek, Winooski, Estados Unidos). A partir de los valores de concentración inicial obtenidos se realizaron las diluciones necesarias para llevar a todas las muestras a una concentración final de ADN de 40 ng/μl.

2.4.1.2.2 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación de la región codificante del gen 16S del ADNr se realizó utilizando los primers específicos universales GC-HDA1 y HDA2 (Cuadro 4), que permiten amplificar la región V3 del gen del ADNr 16S (200 pb) (Li et al., 2003). La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente: dNTPs: 10,4 μl; agua: 20,4 μl; primers (10 pmol/ μl): 2,4 μl de cada uno; Taq polimerasa (5 U/μl): 0,38 μl; cloruro de magnesio (25 mM/ μl): 1,3 μl y ADN molde 2,7 μl.

Para llevar a cabo la técnica se utilizó un termociclador Touch Thermal Cycler T960 (Heal Force, Shanghai, China). El programa de amplificación se encuentra especificado en el Cuadro 5. Para descartar la presencia de contaminaciones, se empleó un control negativo sin ADN.

Cuadro 4. Secuencia de primers utilizados para amplificar el ADN bacteriano presente en la materia fecal de los cerdos.

Primer	Sentido	Secuencia
CG-HDA1	Forward	5'- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3'
HDA2	Reverse	5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTGGCA C-3'

Cuadro 5. Programa utilizado para la amplificación por PCR de la región codificante del gen 16S del ADNr

Fase	Tiempo	T (° C)	Ciclos
Desnaturalización inicial	4m 30s	94	1
Desnaturalización	30s	94	
Hibridación	30s	58	35
Elongación	1m	68	
Elongación final	7m	68	1

Tiempo medido en minutos (m) y segundos (s). T (° C): temperatura medida en ° C.

Con el fin de evidenciar que la amplificación del gen objetivo haya sido adecuada, se realizó una electroforesis en gel de los productos de PCR. Se utilizó un gel de agarosa al 2% en tampón TBE 1X (TRIS-Borato-EDTA). En cada pocillo del gel se sembraron 1,8 µl del producto de PCR de cada muestra y 1,2 µl de buffer de carga con colorante fluorescente GEL RED a una concentración final del 0,01 % (v/v) (Biotium, Freemont, Estados Unidos). Se utilizó un marcador de peso molecular comercial 100 pb DNA Ladder (Pb-1 Productos Bio-lógicos, Buenos Aires, Argentina), del que se sembraron 1,8 µl con 1,2 µl del buffer de carga. La electroforesis se hizo a 80 V por 40 min y se empleó TBE 1X como tampón de corrida. Al finalizar el tiempo indicado, el gel se observó con luz UV en un transluminador (Labnet, Woodbridge, Estados Unidos).

2.4.1.2.3 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

Para realizar la separación del ADN presente en los productos de PCR de cada muestra se utilizó la técnica DGGE usando el equipo D-Code Universal Mutation Detection (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos). Se emplearon geles de 16 x 16 x 0,1 cm de poliacrilamida 8 % p/v con gradiente desnaturalizante urea-formamida 40 %- 60 %. Las condiciones de electroforesis fueron de 60° C y 130 V durante 4 horas (Simpson et al., 2000; Zimmerman 2020).

En cada pocillo del gel se sembraron 10 µl de muestra y 10 µl de buffer de carga. Para normalizar los geles, y poder compararlos, se utilizó como marcador molecular una mezcla de amplicones de las cepas bacterianas *E. coli Nissle*, *L. salivarius* DSPV014C y *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*.

Cumplido el tiempo de la electroforesis los geles se tiñeron sumergiéndolos en solución de 250 ml de buffer TAE 1X con SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) al 1% (v/v) durante 15 min; y a continuación, se colocaron por el mismo tiempo en una solución de lavado compuesta por 250 ml de buffer TAE 1X. Luego se observaron en un transluminador de luz azul Safe Imager Blue-Light (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) y se fotografiaron. Los archivos TIFF de las imágenes se analizaron con el Software BioNumerics versión 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) para la construcción de dendrogramas basados en el método del grupo de pares no ponderado con el promedio aritmético (UPGMA). Además, con el fin de caracterizar el ecosistema microbiano presente en la MF de los cerdos, se calcularon el índice de diversidad de Shannon, el índice de homogeneidad de Pielou y el índice de riqueza de Margalef.

Las bandas observables en el transluminador se cortaron con un bisturí. Los fragmentos cortados se sumergieron en 50 µl agua estéril bidestilada durante 24 h a 4° C para separar el amplicón del gel. Luego se tomaron 2 µl para reamplificar el segmento aislado mediante PCR utilizando las mismas condiciones y primers que en el punto 2.4.1.2.2. Los productos de dicha PCR se purificaron con el kit PURO ADN-Clean Up (PB-L Productos Bio-Lógicos, Bs As, Argentina) y fueron secuenciados por la empresa MACROGEN (Seúl, Corea del Sur). El análisis de las secuencias resultantes se realizó con la plataforma BLAST para nucleótidos, que permite comparar dichas secuencias con las registradas en la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

2.4.2 Score fecal

El estado de salud de los animales se monitoreó diariamente, prestando especial atención al score fecal de cada cerdo. Este se determinó mediante una escala visual de 0 a 3 en base a su consistencia (Loh et al., 2002). Siendo 0: heces en forma de pellet, 1: heces en forma de semi pellet, 2: heces blandas y 3: heces acuosas.

2.4.3 Análisis en sangre

Para tomar las muestras de sangre se eligieron al azar 8 lechones por grupo. A cada animal se le extrajo semanalmente 5 ml de sangre por punción de la vena cava, utilizando agujas hipodérmicas de 40/8.

A cuatro muestras se les incorporó inmediatamente a su obtención ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante (GT – Lab, Rosario, Argentina) y se mantuvieron refrigeradas hasta su procesamiento (no más de 6 h). Las cuatro muestras restantes se dejaron a temperatura ambiente para la formación del coágulo.

El primer muestreo se realizó en la semana 0, antes de comenzar a suministrar la cepa en estudio al GP, repitiéndose en las semanas 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

2.4.3.1 Eritrograma y leucograma

Para evaluar los parámetros sanguíneos de los cerdos, a partir de una alícuota de cada muestra con EDTA se realizó un hemograma utilizando un contador hematológico automatizado Mindray con software para muestras porcinas (Mindray BC-3000Plus, Nanshan, China). Los resultados del eritrograma permitieron analizar recuentos de: glóbulos rojos (GR) (cel/ μ l), hemoglobina (Hgb) (g/dl), hematocrito (Hto) (%), volumen corpuscular medio (VCM) (fl), hemoglobina corpuscular media (HCM) (pg) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) (g/dl). A partir del leucograma se obtuvieron los recuentos de: glóbulos blancos (GB) (cel/ μ l), células polimorfonucleares (PMN) (cel/ μ l) y células mononucleares (MN) (cel/ μ l).

Paralelamente, mediante un frotis teñido con Giemsa y su posterior observación al microscopio, se identificaron y contaron diferentes tipos de leucocitos. Con esta técnica se obtuvo la fórmula leucocitaria relativa (FLR), la que al ser contrastada con el recuento de GB permitió realizar el cálculo de la fórmula leucocitaria absoluta (FLA) de las diferentes líneas celulares. De esta forma se definieron los valores (cel/ μ l) de linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Asimismo, se calculó la relación entre la población de neutrófilos y linfocitos (Índice N/L).

El resultado obtenido de cada parámetro fue contrastado con su respectivo rango de valores normales en cerdos (Schalm's Veterinary Hematology 2010).

2.4.3.2 Bioquímica sanguínea

Las muestras sin EDTA y el resto de las muestras con EDTA (excedente del hemograma) fueron centrifugadas a 3500 g por 15 minutos con el fin de separar el coágulo del suero y el plasma de las células respectivamente. El plasma y el suero fueron almacenados a -20° C hasta su procesamiento.

Sobre el plasma se determinó la concentración de: calcio (mg/dl) a través el método colorimétrico con Arsenazo III (Calcio Plus, GT Laboratorio S.R.L., Santa Fe Argentina); fosfatasa alcalina (U/l), con el método cinético a 405 nm según DGKC/SSCC (Fosfatasa alcalina Liquid Plus, GT Laboratorio S.R.L., Santa Fe Argentina); triglicéridos (mg/dl), mediante el método GPO/PAP (Triglicéridos Liquid Plus, GT Laboratorio S.R.L., Santa Fe Argentina) y colesterol (mg/dl) con el método CHOD/P AP (Colesterol Liquid Plus, GT Laboratorio S.R.L., Santa Fe Argentina). A partir del suero se determinó la concentración de fósforo inorgánico (mg/dl), utilizando el método directo U.V. (Fósforo Inorgánico UV, GT Laboratorio S.R.L., Santa Fe Argentina). Todas las determinaciones realizadas se hicieron sobre las muestras correspondientes a las semanas 0, 1, 3 y 6 de ambos grupos.

Los valores encontrados se compararon con los rangos normales indicados para la especie porcina (Egeli et al., 1998; Perri et al., 2017).

2.4.4 Morfología intestinal

Al finalizar el experimento se eligieron al azar tres animales de cada grupo experimental, que fueron sacrificados para realizar extracción de tejidos. La faena se realizó en un frigorífico habilitado por SENASA ubicado en la localidad de San Andrés de Giles, provincia de Buenos Aires (34° 42' S, -59° 28' W).

Se tomaron muestras de los diferentes segmentos del intestino delgado: duodeno, yeyuno e íleon. Se cortaron trozos de aproximadamente 2 cm de largo, los que fueron abiertos para exponer las vellosidades y fijados en formol tamponado al 10% (v/v).

Las muestras fueron enviadas al Servicio de Histotecnología del Área Morfología de la FCByF-UNR donde se realizó el procedimiento habitual de técnica histológica para inclusión en parafina y se hicieron cortes de 5 μ de grosor. Éstos se tiñeron con la técnica

de hematoxilina-eosina (García del Moral, 1993). De cada muestra se realizaron 3 cortes no contiguos.

Cada corte fue analizado mediante un microscopio binocular con iluminación LED (Zeiss, modelo Axio Lab A1) y fotografiado (Zeiss, modelo AxioCam ERc 5s).

A partir de las fotografías se midió la altura de las vellosidades (V) y la profundidad de las criptas (C), estas solo fueron medidas cuando la vellosidad estuvo bien orientada y se podía apreciar su respectiva cripta. De cada corte se midieron las 10 vellosidades más largas desde la punta hasta la apertura de la cripta; y sus respectivas criptas, desde su apertura hasta su base (Nabuurs, et al. 1993 y Pluske, et al. 1996). Dichas mediciones se realizaron con el programa Zen 2.6 (blue edition). A partir de los valores obtenidos, se calculó también la relación V/C.

2.4.5 Indicadores productivos

A fin de evaluar el desempeño productivo de los cerdos se registró, semanalmente, el peso individual y se midió el consumo de alimento por jaula, determinándolo como la diferencia entre el alimento entregado y el rechazado. A partir de estos datos y mediante las fórmulas que se indican a continuación se calculó: la ganancia de peso media diaria (GMD), el consumo de alimento medio diario (CMD) y la conversión alimenticia global (CA). El cálculo de la CA en forma individual no fue posible ya que los animales se manejaron de a pares. Sin embargo, se consideró conveniente obtener un dato estimativo de una de las variables más importantes de la producción. Para ello fue necesario calcular el consumo total de alimento y el aumento de peso total, es decir, los kg acumulados durante todo el experimento.

$$GMD = \frac{\textit{peso final} - \textit{peso inicial}}{\textit{n}^{\circ} \textit{de días transcurridos}}$$

$$CMD = \frac{\textit{alimento entregado} - \textit{alimento rechazado}}{\textit{n}^{\circ} \textit{de días transcurridos}}$$

$$CA = \frac{\text{consumo total de alimento (kg)}}{\text{aumento de peso total (kg)}}$$

2.5 Análisis estadístico

Para evaluar los recuentos de poblaciones microbianas a través del tiempo, los análisis se realizaron en cada grupo por separado mediante modelos lineales mixtos. Cuando no se cumplieron los supuestos de los errores se modeló la estructura de la varianza-covarianza de los errores considerando las semanas. Para evaluar si hubo diferencias, en el recuento de poblaciones microbianas entre grupos, en cada semana se realizó una prueba t-student para muestras independientes.

Los índices de diversidad de Shannon, Homogeneidad de Pielou y Riqueza de Margalef se analizaron mediante un análisis de la varianza, considerando las medidas repetidas en el tiempo, utilizando modelos lineales mixtos. Las medias ajustadas se compararon mediante la prueba de Fisher ($\alpha= 0,05$).

La evaluación del score fecal en ambos grupos se realizó mediante el cálculo de las frecuencias relativas de cada score y se analizó su distribución mediante un test Chi cuadrado. Además, se analizaron gráficamente las distribuciones de las frecuencias absolutas semanales de cada score fecal para ambos grupos.

Los recuentos obtenidos del eritrograma y leucograma como así también los valores de calcio, fósforo inorgánico, fosfatasa alcalina, triglicéridos y colesterol fueron analizados por grupo a través de modelos lineales mixtos, considerando las medidas repetidas en el tiempo y ajustando la matriz de varianza-covarianza de los errores cuando correspondió. Además, se realizó una prueba t-student para muestras independientes con el fin de identificar diferencias entre grupos para cada momento. Para basófilos y eosinófilos se hizo un análisis descriptivo para indicar media, error estándar y mediana. Adicionalmente se realizó para cada semana una prueba de Wilcoxon para muestras independientes con el objetivo de determinar diferencias significativas entre grupos.

Las diferencias entre las variables AMD, CMD y evolución del PV entre grupos se evaluaron en un análisis de la varianza, considerando las medidas repetidas en el tiempo, mediante modelos lineales mixtos. Las medias ajustadas se compararon mediante la prueba de Fisher ($\alpha= 0,05$). Por otro lado, el peso vivo final (PVf) se evaluó mediante una t-

student para muestras independientes y para la CA, el consumo total y el aumento de peso total se realizó una prueba de Wilcoxon para muestras independientes.

Las mediciones de vellosidades intestinales fueron analizadas mediante una t-student para muestras independientes.

En todos los casos se utilizó InfoStat (Di Rienzo et al., 2012).

3. RESULTADOS

3.1 Microbiota

3.1.1 Recuento de poblaciones microbianas

Los recuentos de las poblaciones microbianas estudiadas en la MF de los lechones a lo largo del experimento se pueden apreciar en el Cuadro 6. Allí se observa que en el GC los valores de *L. salivarius* DSPV014C fueron, en todos los muestreos, inferiores al límite de detección (2 log UFC/g MF). Este resultado coincide con el obtenido para el GP en la semana 0. Sin embargo, en este último grupo, cuando se analizan las semanas siguientes puede verse que el inóculo fue recuperado en concentraciones superiores a 2,98 log UFC/g MF y dicha concentración se modificó a lo largo del tiempo ($p= 0,0314$).

En cuanto a las demás poblaciones examinadas, puede notarse que tanto para el GC como para el GP los recuentos variaron en el tiempo ($p < 0,05$). Cuando se comparan ambos grupos en cada semana, los recuentos de Levaduras y *E. coli* no muestran diferencias significativas en ningún momento. Por el contrario, para BAL hubo diferencias entre grupos en la semana 1 ($p= 0,0200$) y para *Campylobacter* spp. en la semana 3 ($p= 0,0467$).

Como producto de los recuentos mencionados fue posible calcular las relaciones que se presentan en el Cuadro 7. Dado que todas las poblaciones variaron en el tiempo también lo hicieron las distintas relaciones medidas entre MO ($p < 0,05$), a excepción de la relación *L. salivarius* DSPV014C /BAL que se mantuvo estable ($p= 0,0721$). Los valores de la cepa en estudio se mantuvieron entre 0,36 y 0,56 con respecto al total de BAL.

En el GC la relación BAL/ *E. coli* fue mayor a uno en todas las semanas, asumiendo valores entre 1,03 y 2,93. Por otro lado en el GP el valor mínimo se dio en la semana 0 y fue de 0,91, en las siguientes semanas (coincidiendo con el inicio de la administración diaria de *L. salivarius* DSPV014C) las relaciones fueron mayores a uno alcanzando su máximo en la semana 3 (3,46). Para la relación BAL/ Levaduras se obtuvieron valores entre 1,52 y 3,57, y entre 1,84 y 3,53 para el GC y GP respectivamente. En esta relación se encontraron diferencias significativas entre grupos únicamente en la semana 1 ($p= 0,0358$).

En cuanto a la relación BAL/ *Campylobacter* spp. hubo diferencias entre grupos en la semana 3 ($p= 0,0215$) y los valores extremos fueron 1,18 y 2,63 para el GC, y 1,18 y 3,22 para el GP.

Cuadro 6. Recuento semanal de poblaciones microbianas expresado en log de las UFC por gramo de materia fecal (log UFC/g MF)

	Semana							<i>p</i> -valor
	0	1	2	3	4	5	6	
<i>L. salivarius</i> log (UFC/g MF)								
GC	< LD							
GP	< LD	4,06± 0,32 ab	3,72± 0,27 b	3,76± 0,07 b	4,04± 0,45 ab	4,39± 0,18 a	2,98± 0,51 b	0,0314
BAL totales log (UFC/g MF)								
GC	7,65± 0,22 a	8,23± 0,22 ab A	7,86± 0,22 ab	8,11± 0,22 ab	8,55± 0,22 b	8,58± 0,22 b	8,34± 0,24 b	0,0429
GP	7,54± 0,55 a	9,02± 0,09 b B	7,95± 0,13 a	8,17± 0,10 a	8,67± 0,11 a	7,92± 0,40 a	8,33± 0,15 a	<0,0001
<i>p</i>-valor	0,8478	0,0200	0,7134	0,7891	0,5656	0,2275	0,3860	
Levaduras log (UFC/g MF)								
GC	4,35± 0,18 a	5,43± 0,15 b	3,83± 0,22 a	2,55± 0,36 cd	2,98± 0,21 c	2,54± 0,28 cd	2,44± 0,16 d	<0,0001
GP	4,06± 0,38 ab	5,01± 0,36 a	4,24± 0,25 a	2,81± 0,51 bc	3,02± 0,49 bc	2,88± 0,40 bc	2,57± 0,36 c	0,0002
<i>p</i>-valor	0,5074	0,3175	0,2441	0,6846	0,9396	0,5032	0,7362	
<i>E. coli</i> log (UFC/g MF)								
GC	7,48± 0,43 a	6,37± 0,43 ab	4,96± 0,43 cd	3,02± 0,43 e	5,18± 0,43 bc	4,32± 0,43 cd	3,82± 0,43 de	<0,0001
GP	8,37± 0,50 a	7,42± 0,50 a	4,46± 0,50 b	2,59± 0,50 c	3,92± 0,50 bc	4,58± 0,50 b	4,77± 0,50 b	<0,0001
<i>p</i>-valor	0,0604	0,1507	0,3963	0,4467	0,0928	0,7075	0,3371	
<i>Campylobacter</i> termotolerantes log (UFC/g MF)								
GC	6,53± 0,34 a	5,15± 0,34 b	4,41± 0,34 bc	3,10± 0,34 d A	3,52± 0,34 cd	4,10± 0,34 c	3,45± 0,34 cd	<0,0001
GP	6,45± 0,45 a	5,46± 0,45 ab	4,61± 0,45 bc	4,16± 0,45 c B	3,83± 0,45 cd	2,80± 0,45 d	3,42± 0,45 cd	<0,0001
<i>p</i>-valor	0,8263	0,7060	0,6153	0,0467	0,5654	0,0670	0,9632	

Valores expresados en media ± error estándar. GC: grupo control; GP: grupo probiótico. LD: límite de detección 2 log (UFC/g MF). Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas en el tiempo dentro de cada grupo ($p < 0,05$). Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre grupos en cada semana ($p < 0,05$).

Cuadro 7. Relaciones entre poblaciones microbianas muestreadas en materia fecal de lechones

	Semana							<i>p- valor</i>
	0	1	2	3	4	5	6	
Relación <i>L. salivarius</i> DSPV014C/BAL								
GP	-	0,45± 0,03	0,47± 0,03	0,46± 0,01	0,47± 0,05	0,56± 0,04	0,36± 0,06	0,0721
Relación BAL/ <i>E. coli</i>								
GC	1,03± 0,05 a	1,34± 0,13 b	1,64± 0,12 b	2,93± 0,40 c	1,72± 0,16 b	2,10± 0,26 bc	2,22± 0,45 bc	<0,0001
GP	0,91± 0,08 a	1,25± 0,11 b	1,82± 0,11 bc	3,46± 0,42 d	2,41± 0,32 cd	1,85± 0,22 bc	2,15± 0,51 bcd	<0,0001
<i>p- valor</i>	0,2414	0,6248	0,2980	0,3857	0,0878	0,4826	0,9282	
Relación BAL/ Levaduras								
GC	1,78± 0,12 ab	1,52± 0,05 b A	2,10± 0,16 a	3,48± 0,43 c	2,95± 0,23 c	3,57± 0,39 c	3,25± 0,43 c	<0,0001
GP	1,90± 0,14 a	1,84± 0,12 a B	1,91± 0,10 b	2,81± 0,41 b	3,28± 0,51 b	3,02± 0,40 b	3,53± 0,43 b	0,0006
<i>p- valor</i>	0,5550	0,0358	0,3493	0,2957	0,5717	0,3476	0,6427	
Relación BAL/<i>Campylobacter</i> spp								
GC	1,18± 0,05 a	1,68± 0,16 b	1,82± 0,12 b	2,63± 0,11 c A	2,46± 0,12 bc	2,21± 0,28 bc	2,58± 0,58 bc	<0,0001
GP	1,18± 0,10 a	1,74± 0,17 b	1,76± 0,11 b	2,05± 0,18 bc B	2,51± 0,41 bcd	3,22± 0,46 d	2,75± 0,44 cd	<0,0001
<i>p- valor</i>	0,9764	0,7954	0,7156	0,0215	0,9012	0,0897	0,8151	

Valores expresados en media ± error estándar. GC: grupo control; GP: grupo probiótico. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas en el tiempo dentro de cada grupo ($p < 0,05$). Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre grupos en cada semana ($p < 0,05$).

3.1.2 Dinámica poblacional de la microbiota predominante

3.1.2.1 Perfil obtenido a partir de la DGGE

La Figura 4 muestra el dendrograma obtenido a partir de la DGGE para los cerdos en la semana 0. En este caso pueden verse dos clusters principales con un 15 % de similitud, encontrándose dentro de ellos muestras pertenecientes a animales tanto del GC como del GP, por lo que puede decirse que no se diferencian entre grupos. Los patrones obtenidos presentaron entre 4 y 15 bandas por calle.

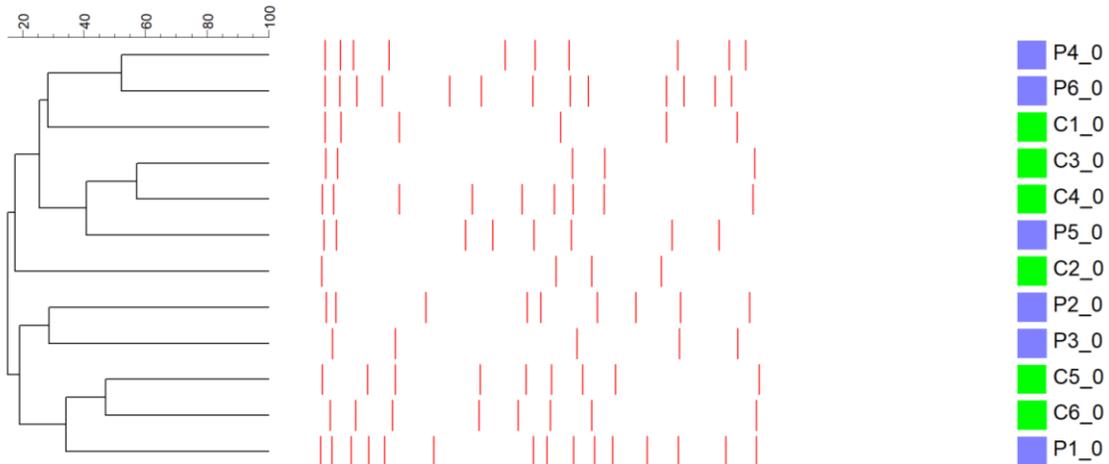


Figura 4. Dendrograma de los perfiles DGGE de la microbiota predominante en la materia fecal de los cerdos en la semana 0.

C: Grupo Control. P: Grupo Probiótico.

Para la semana 3 (Figura 5), no se ven agrupamientos que formen clusters principales. Para este momento se encontraron entre 3 y 12 bandas por calle, siendo las muestras del GC las que tuvieron menor número de bandas (GC: entre 3 y 8 vs GP: entre 9 y 12).

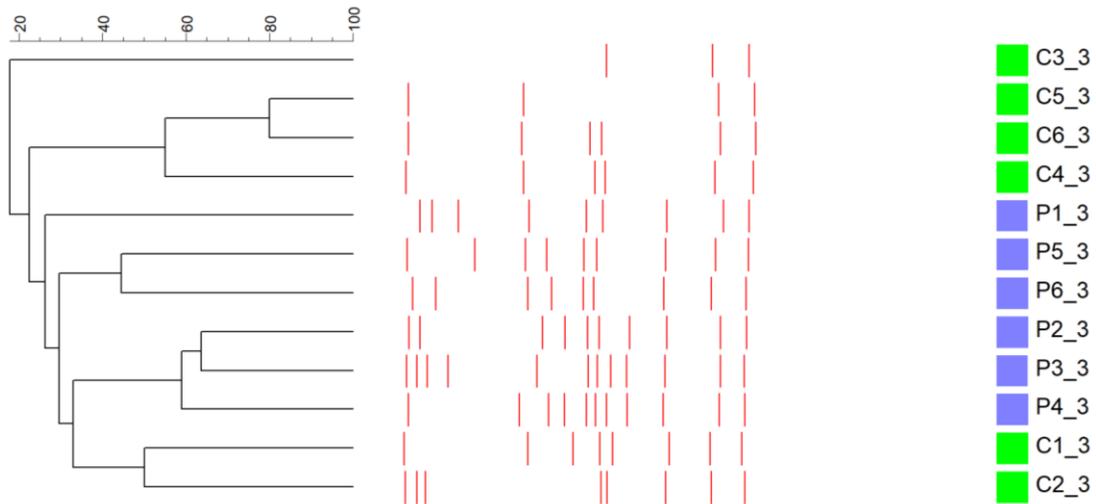


Figura 5. Dendrograma de los perfiles DGGE de la microbiota predominante en la materia fecal de los cerdos en la semana 3.

C: Grupo Control. P: Grupo Probiótico.

En el dendrograma correspondiente a la última semana (Figura 6), se observa un cluster principal, con una similitud del 18 %, uno de ellos está conformado por una sola muestra del GC, el otro conforma un nuevo cluster con un 24 % de similitud, que a su vez, vuelve a separarse en dos. Los grupos experimentales estuvieron repartidos sin seguir un

patrón visible, por lo que no puede establecerse una diferencia entre grupos a partir de este dendrograma.

Al ver los resultados de todas las semanas en conjunto para cada grupo experimental (Figuras 7 y 8) podría decirse que la evolución de la microbiota en ambos grupos fue diferente a lo largo del tiempo. Por un lado, la diferenciación no fue tan marcada en el GC, si bien hay varios clusters bien marcados, dentro de ellos se agrupan muestras de distintas semanas. Por el otro lado, el dendrograma que agrupa todas las semanas del GP (Figura 8), muestra 2 clusters con una similitud del 14 %. El primero, con un 15 % de similitud, agrupa las semanas 0 y 3. El segundo contiene todas las muestras de la semana 6, con un 20 % de similitud entre sí.

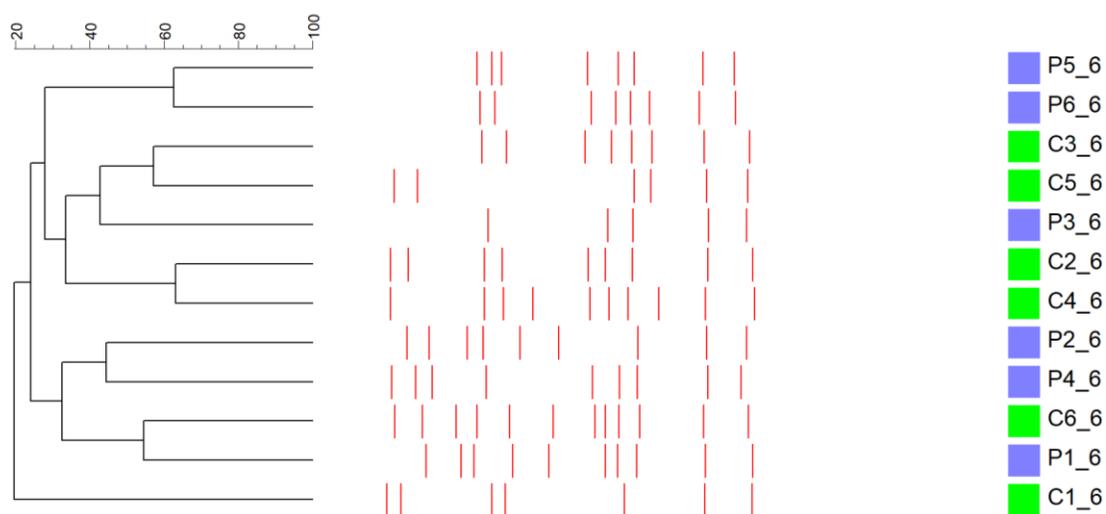


Figura 6. Dendrograma de los perfiles DGGE de la microbiota predominante en la materia fecal de los cerdos en la semana 6.

C: Grupo Control. P: Grupo Probiótico.

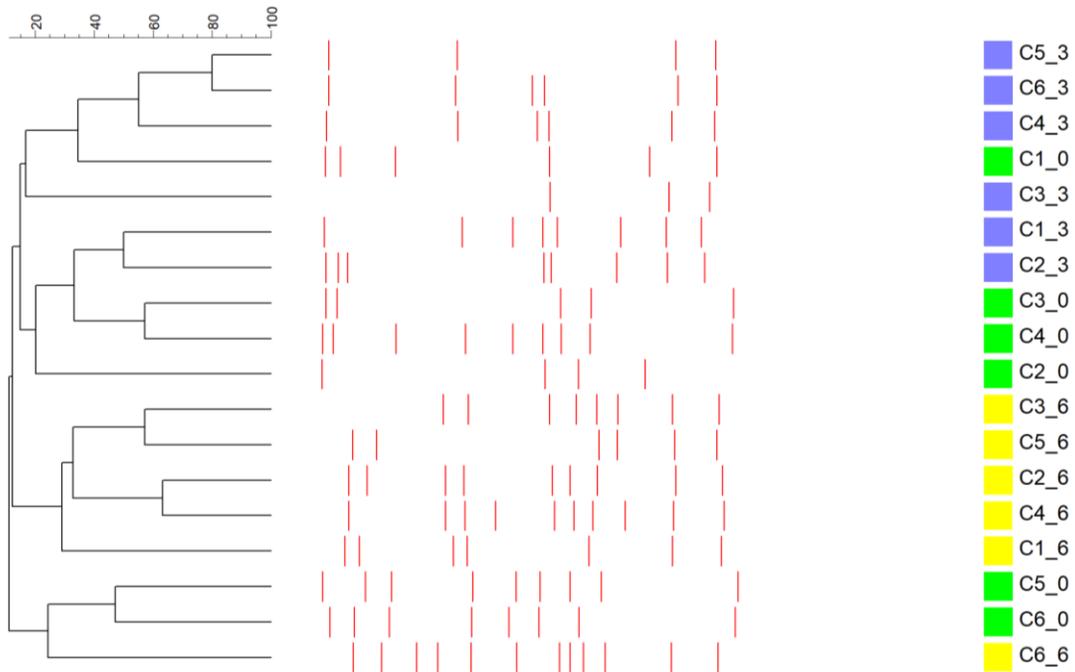


Figura 7. Dendrograma de los perfiles DGGE de la microbiota predominante en la materia fecal de los cerdos del Grupo Control para las semanas 0, 3 y 6.

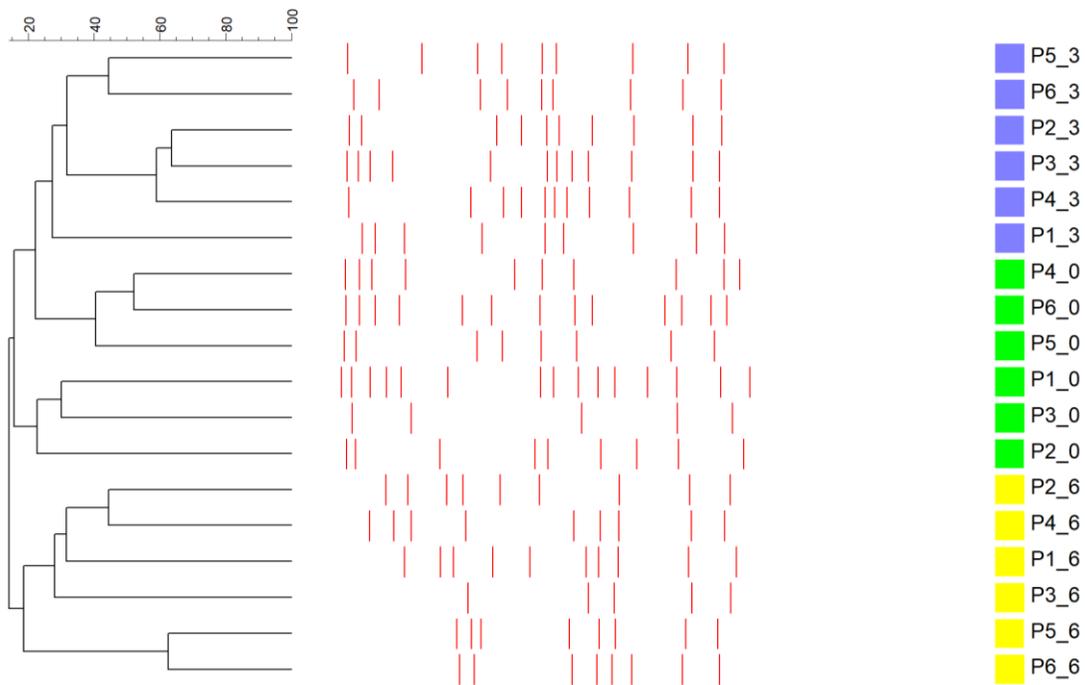


Figura 8. Dendrograma de los perfiles DGGE de la microbiota predominante en la materia fecal de los cerdos del Grupo Probiótico para las semanas 0, 3 y 6

Los resultados de diversidad, homogeneidad y riqueza del microbioma de la MF de los cerdos se presentan en el cuadro 8. Para los índices de Shannon y Margalef la interacción entre grupo y semana resultó significativa (Cuadro 8).

En cuanto a la diversidad, en el GC el índice promedio se mantiene constante a través de las semanas. Sin embargo, en el GP hay un aumento significativo en la semana 3. A su vez, en dicha semana, el índice para el GP presentó un aumento significativo respecto al GC (2,02 vs 1,43).

Con relación al índice de Margalef, al comparar entre semanas, en el GC se produce un aumento significativo de la riqueza microbiana en la semana 6. Respecto al GP el índice promedio se mantuvo constante a lo largo de todas las semanas. Adicionalmente, se observó que el índice promedio en la semana 3, es significativamente mayor para el GP (1,67 vs 0,96).

Finalmente, para el índice de Pielou la interacción resultó no significativa.

Cuadro 8. Índices de diversidad, homogeneidad y riqueza del microbioma de la materia fecal de cerdos en etapa de recría

Índice	Grupo	Semana			<i>p</i> -valor Semana*Grupo
		0	3	6	
Diversidad de Shannon	GC	1,42± 0,12 b	1,43± 0,12 b	1,77± 0,12 ab	0,0119**
	GP	1,69± 0,13 b	2,02± 0,15 a	1,54± 0,12 b	
Homogeneidad de Pielou	GC	0,74± 0,03	0,85± 0,03	0,82± 0,03	0,1462
	GP	0,78± 0,04	0,87± 0,04	0,74± 0,03	
Riqueza de Margalef	GC	1,29± 0,15bc	0,96± 0,15c	1,81± 0,15a	0,0665*
	GP	1,51± 0,17ab	1,67± 0,19ab	1,73± 0,15a	

Valores expresados en media ± error estándar. GC: grupo control; GP: grupo probiótico. Letras distintas indican diferencias significativas (p< 0,05). * p< 0,10; **p< 0,05

3.1.2.2 Caracterización taxonómica de la microbiota presente en la materia fecal

Del total de las secuencias identificadas, 19 correspondieron a bacterias no cultivables. En cuanto a *phylum*, las coincidencias fueron de un 76 % *Firmicutes*, 16 % *Bacteroidetes*, 4 % *Synergistetes* y el 4 % restante *Proteobacterias*. Dentro de *Bacteroidetes*, el 100 % se correspondió con la clase *Bacteroidia*, orden *Bacteroidales*, y en este último, el 33 % concuerda con MO de la familia *Porphyromonadaceae* y el 67 % a *Prevotellaceae*. El orden *Firmicutes* fue el que presentó mayor variabilidad, habiendo 2

clases diferentes, el 21 % representado por *Bacilli* (donde el 100 % de las familias encontradas fueron *Lactobacillaceae*) y el 79 % por *Clostridia* (Figura 9).

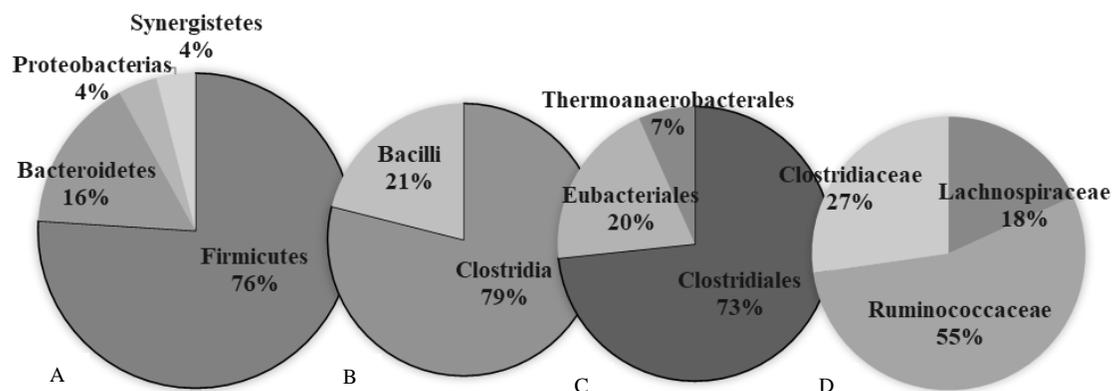


Figura 9. Distribución porcentual de A: phylum, B: clases (dentro de *Firmicutes*), C: órdenes (dentro de *Clostridia*) y D: familias (dentro de *Clostridiales*) encontrados en la materia fecal de cerdos en etapa de recría.

En los cuadros 9, 10 y 11 se presentan los resultados de la secuenciación del ADN aislado de la MF de los lechones.

Las muestras pertenecientes a la semana 0 (Cuadro 9) tuvieron un porcentaje de similitud con secuencias del Genbank de entre 86,27 % y 95,98 %, estando presentes los phylum *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. El primero fue el de mayor aparición (banda 2, 3, 6, 10 y 11) y dentro de éste la clase *Clostridia* orden *Clostridiales* fueron predominante. Las especies de mayor similitud con las secuencias del Genbank correspondieron a las familias *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Eubacteriaceae* y *Clostridiaceae*. En el mismo phylum, hubo una coincidencia para la clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae*. Por otro lado, la especie correspondiente a la banda 5 coincide con el phylum *Bacteroidetes* y pertenece a la clase *Bacteroidia*, orden *Bacteroidales*, familia *Porphyromonadaceae*.

Cuadro 9. Porcentaje de identidad de secuencias parciales del gen 16S ARNr presente en la materia fecal de lechones en la semana 0, comparadas con las secuencias presentes en la base de datos del NCBI

Banda	Grupo	Phylum	Especie relacionada	Identidad (%)	N° NCBI
1	GP	Firmicutes	Uncultured Ruminococcaceae bacterium clone 9077 uncultured Oscillospiraceae bacterium	91,76 %	KP109112.1
2	GP	Bacteroidetes	Uncultured Barnesiella sp. clone 10995	91,76 %	KP102100.1
	GP	Firmicutes	Uncultured Lachnospiraceae bacterium clone 6856	86,27 %	KP107837.1
3	GP	Firmicutes	Uncultured Garciella sp. clone 6924	87,66 %	KP107893.1
	GP	Firmicutes	Uncultured Blautia sp. clone 14726	86,27 %	KP103465.1
4	GP		Uncultured bacterium isolate DGGE gel band GC30_b15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93,18 %	KJ630789.1
5	GP	Bacteroidetes	Uncultured Porphyromonadaceae bacterium clone 3195	91,46 %	KP105533.1
6	GP	Firmicutes	Lactiplantibacillus plantarum strain 8P-A3	89,47 %	CP046726.1
7	GP	Bacteroidetes	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone Grap1_Lb2d_C5	95,98 %	KP716742.1
	GP	Bacteroidetes	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone Grap1_Lb2a_H3	95,40 %	KP716743.1
8	GC		Uncultured bacterium clone 16S(V3-V4)-241	91,84 %	MH196810.1
9	GC		Uncultured prokaryote clone Otu03271 16S ribosomal RNA gene	94,34 %	MG855307.1
10	GC	Firmicutes	Uncultured Clostridium sp. clone 18070	85,82 %	KP104383.1
	GC	Firmicutes	Uncultured Coprococcus sp. clone 7053	85,82 %	KP107983.1
11	GC	Firmicutes	Uncultured Thermoanaerobacterales bacterium clone OTU70_1	94,74 %	HQ416826.1

GP: grupo probióticos, GC: grupo control. NCBI: National Center for Biotechnology Information.

Para la semana 3, el porcentaje de similitud estuvo entre 85,71 % y 100 %. Dentro del *phylum Firmicutes* (bandas 13, 14 y 18), hubo similitudes con especies pertenecientes a la clase *Clostridia*, orden *Clostridiales*, familias *Ruminococcaceae* y *Clostridiaceae*; y a la clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae*. Además, se encontró una especie perteneciente al *phylum Bacteroidetes* (Banda 22), clase *Bacteroidia*, orden *Bacteroidales*, familia *Prevotellaceae*. La banda 12 tuvo similitud con una especie perteneciente al *phylum Proteobacteria*, clase *Deltaprotobacteria* (Cuadro 10).

Las muestras correspondientes a la última semana experimental (Cuadro 11) tuvieron un porcentaje de similitud de entre 87,31 % y 97,56 % respecto a las secuencias registradas en el Genbank. Habiendo coincidencias con los *phylum Firmicutes* (bandas: 23, 24, 27, 30, 31 y 34) y *Synergistetes*.

Cuadro 10. Porcentaje de identidad de secuencias parciales del gen 16S ARNr presente en la materia fecal de lechones en la semana 3, comparadas con las secuencias presentes en la base de datos del NCBI

Banda	Grupo	Phylum	Especie relacionada	Identidad (%)	N° NCBI
11	GP		Uncultured bacterium gene	92,00 %	LC196362
12	GP	Proteobacteria	Uncultured delta proteobacterium clone tgr_wlfz-430	92,75 %	KT322610.1
13	GP	Firmicutes	Uncultured lactobacillus sp. Clone 1090	93,26 %	KP102068.1
14	GP	Firmicutes	Uncultured ruminococcaceae bacterium clone 8943	86,00 %	KP109030.1
15	GP	Firmicutes	Uncultured anaerovorax sp. Clone 13854	85,71 %	KP103171.1
	GP		Uncultured bacterium clone	95,39 %	KY285818.1
16	GP		Uncultured bacterium clone RL246_AAI75E11	92,76 %	DQ793684.1
17	GP		Uncultured bacterium clone 02B01	93,38 %	GQ132747.1
18	GP	Firmicutes	Uncultured clostridium sp. Clone 7046	100,00 %	KP107978.1
	GP	Firmicutes	Uncultured ethanoligenens sp. Clone 5643	100,00 %	KP106880.1
19	GC		Uncultured bacterium clone 1108	91,46 %	KU506322.1
20	GC		Uncultured bacterium clone NCD2700H06C1	100,00 %	JF221760
	GC		Sludge granule bacterium 5	94,00 %	EF190024.1
21	GC		Uncultured bacterium isolate DGGE GEL BAND 22	92,00 %	DQ660942.1
22	GC	Bacteroidetes	Uncultured prevotella sp. Clone 2667	91,28 %	KP105135.1

GP: grupo probióticos, GC: grupo control. NCBI: National Center for Biotechnology Information.

Cuadro 11. Porcentaje de identidad de secuencias parciales del gen 16S ARNr presente en la materia fecal de lechones en la semana 6, comparadas con las secuencias presentes en la base de datos del NCBI

Banda	Grupo	Phylum	Especie relacionada	Identidad (%)	N° NCBI
23	GP	Firmicutes	Uncultured Clostridiales Family IV bacterium clone denovo271105	91,67 %	KY665342.1
24	GP	Firmicutes	Uncultured Lactobacillus sp. clone 1090	93,18 %	KP102068.1
25	GP		uncultured bacterium partial 16S rRNA gene	89,44 %	LR638837.1
26	GP		Uncultured bacterium clone E416QYJ01FMJ5R 16S ribosomal RNA gene	89,93 %	HQ294353.1
27	GP	Firmicutes	Uncultured Acetivibrio sp. clone denovo211272	96,20 %	KY664368.1
28	GP		Uncultured bacterium clone OTU_3981	97,26 %	KX971535.1
			Uncultured bacterium clone DF2287	93,90 %	GU610464.1
29	GC		Uncultured bacterium clone T1_1_189	90,70 %	JQ135070.1
30	GC	Firmicutes	Uncultured Clostridium sp. clone zeo13	98,03 %	KF530899.1
31	GC	Firmicutes	Uncultured Ruminococcaceae bacterium clone 6208	87,31 %	KP107345.1
32	GC	Firmicutes	Uncultured Prevotella sp. clone 2335	91,23 %	KP104870.1
33	GC		Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, OTU01068.	90,79 %	LT007929.1
34	GC	Firmicutes	Uncultured Lactobacillus sp. clone DA DC 1387	91,12 %	ON028231.1
35	GC	Synergistetes	Uncultured Thermovirga sp. clone R1_D54_S20_G02	92,86 %	MN270920
36	GC		Uncultured bacterium clone GDIC2IK01EZ1YF	97,56 %	JF648315.1

GP: grupo probióticos, GC: grupo control. NCBI: National Center for Biotechnology Information.

3.2 Score fecal

El Cuadro 12 muestra los resultados del análisis del score fecal de los lechones durante todo el ensayo. Allí se indica que el score fecal es independiente del grupo, es decir que la distribución de las frecuencias de cada score fecal fue similar en ambos grupos. Se destaca que el 94,5 % de las observaciones en el GC y el 95,5 % en el GP corresponden al score fecal 0 y el score fecal 3 representa el 0,7 % en el GC y 0 % en el GP.

Cuadro 12. Distribución de frecuencias relativas del score fecal para cada grupo

Score fecal	GC (%)	GP (%)	<i>p</i> -valor
0	94,5	95,5	0,3786
1	3,0	3,0	
2	1,8	1,5	
3	0,7	0	

GC: grupo control. GP: grupo probiótico. Probabilidad asociada < 0,05 indica diferencias significativas entre grupos.

Por otro lado, cuando se analiza la distribución de las observaciones de cada score fecal por semana diferenciado por grupo (Figura 10), puede notarse que el score fecal 3 (heces acuosas) se presentó solamente en las semanas 1 y 2 en el GC. Además, en dichas semanas se agruparon la mayoría de los registros del score fecal 1 y 2 para ambos grupos.

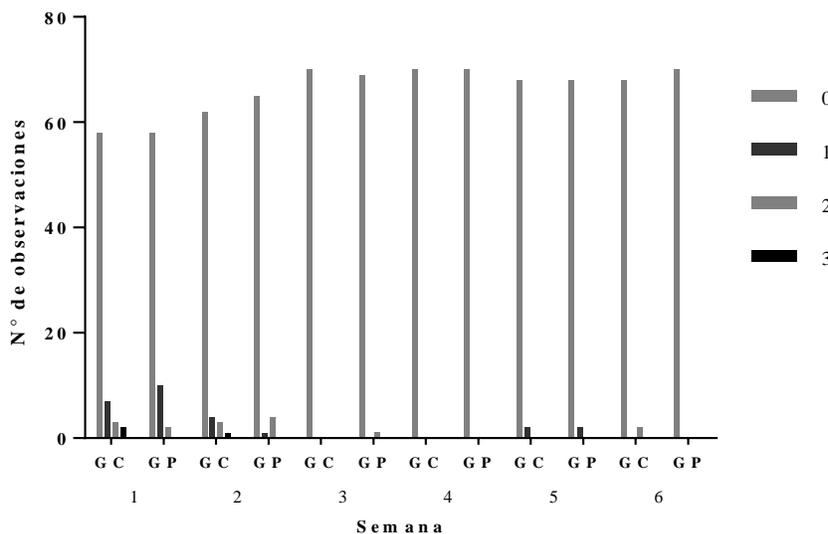


Figura 10. Número de observaciones según score fecal y tratamiento en cada semana para el grupo control (GC) y el grupo probiótico (GP).

Escala visual de 0 a 3 en base a la consistencia de la materia fecal. 0: heces en forma de pellet, 1: heces en forma de semi pellet, 2: heces blandas y 3: heces acuosas (Loh et al., 2002).

3.3 Análisis en sangre

3.3.1 Eritrograma y leucograma

Los resultados del eritrograma se presentan en la Figura 11. En ambos grupos los recuentos de GR se mantuvieron dentro del rango de valores normales en porcinos durante todo el estudio (excepto en la semana 0 para el GC, donde el valor obtenido fue mayor al límite superior). En el GC los datos fueron similares en las distintas semanas ($p > 0,05$) y, por el contrario, en el GP hubo variaciones a lo largo del tiempo ($p = 0,0009$). La semana 5 fue la única que mostró diferencias al comparar ambos grupos ($p = 0,0087$), siendo mayor el valor encontrado en el GC.

Los datos obtenidos para Hgb muestran que hubo variaciones a lo largo del tiempo para los dos grupos ($p < 0,05$) y la única diferencia entre ambos también se dio en la semana 5 ($p = 0,0478$) siendo el GC superior. Además, los valores estuvieron dentro de los rangos normales en la semana 3 y 6 para el GP y a partir de la tercera semana para el GC (Figura 11).

Para Hto no se observaron diferencias entre grupos en ningún momento ($p > 0,05$). Sin embargo, cuando se analizó cada grupo por separado, sí se vieron diferencias a lo largo del tiempo (GC: $p = 0,0202$ y GP: $p = 0,0007$). Los valores de Hto en ambos grupos sólo estuvieron fuera del rango normal indicado para cerdos en la semana 1.

Los valores de VCM variaron en el tiempo (GC: $p < 0,0001$ y GP: $p = 0,0015$) pudiendo inferir que el comportamiento de ambos fue similar ya que no hubo diferencias entre grupos en ninguna semana. Este parámetro coincidió con valores normales a partir de la semana 3 para el GP y semana 4 para el GC.

La HCM y la CHCM siempre estuvieron por debajo del valor mínimo normal indicado para dichos parámetros. Además, no se encontraron diferencias entre grupos para ninguna de las dos variables. En HCM hubo variaciones en el tiempo tanto para el GC como para el GP ($p < 0,0001$ y $p = 0,0023$ respectivamente). En cuanto a CHCM solo hubo variaciones en el tiempo en el GC ($p < 0,0001$).

En relación al análisis del leucograma, se encontró que la población de GB tanto en el GC como en el GP sufrió modificaciones en el tiempo (GC: $p = 0,0005$ y GP: $p = 0,0026$),

hallándose los mayores valores en las semanas 5 y 6 en el GC y en la semana 2 en el GP. Sólo en la semana 0 hubo diferencias entre grupos ($p= 0,0038$).

Las células PMN en su conjunto se comportaron de manera constante a lo largo de las semanas en ambos grupos ($p> 0,05$), y entre ellos no se diferenciaron en ningún momento ($p> 0,05$). Por el contrario, las células MN sí variaron en el tiempo (GC: $p= 0,0162$ y GP: $p= 0,0136$) y al igual que los GB, mostraron diferencias significativas entre grupos en la semana 0 ($p=0,0451$) (Figura 12). Cabe destacar que, para los 3 parámetros mencionados, las cifras encontradas estuvieron siempre dentro del rango de valores normales para la especie (Schalm's Veterinary Hematology 2010) excepto el GC en MN para la semana 6, donde el valor fue mayor al límite superior.

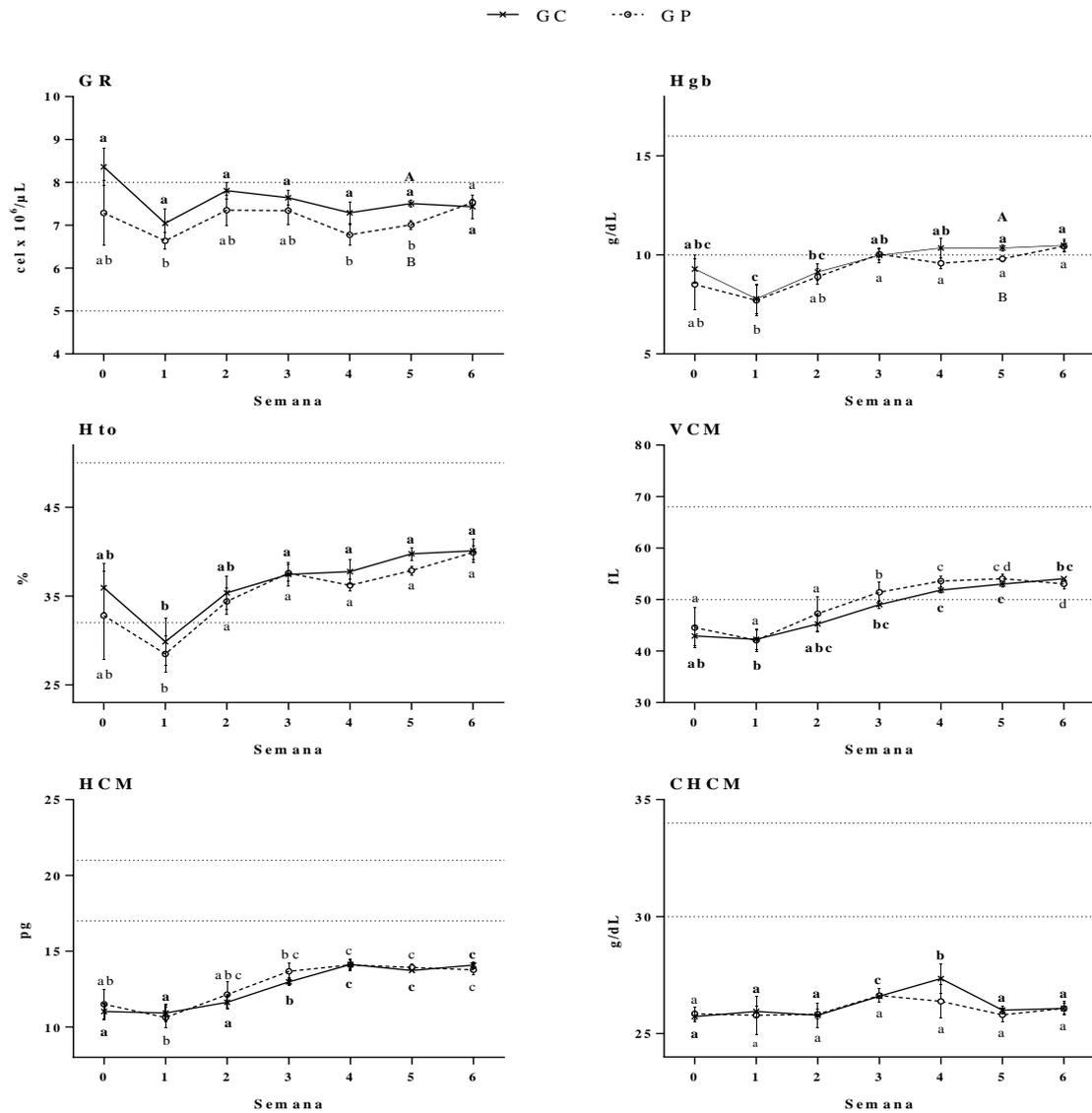


Figura 11. Evolución semanal de parámetros sanguíneos obtenidos del eritrograma para cerdos del grupo control (GC) y grupo probiótico (GP).

Valores expresados en Media± E.E. Las líneas punteadas indican el rango de valores normales en porcinos (Schalm's Veterinary Hematology 2010). GR: glóbulos rojos. Hgb: hemoglobina. Hto: hematocrito. VCM: volumen corpuscular medio. HCM: hemoglobina corpuscular media. CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas en el tiempo dentro de cada grupo ($p < 0,05$) (negrita para GC, normal GP). Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre grupos en cada semana ($p < 0,05$).

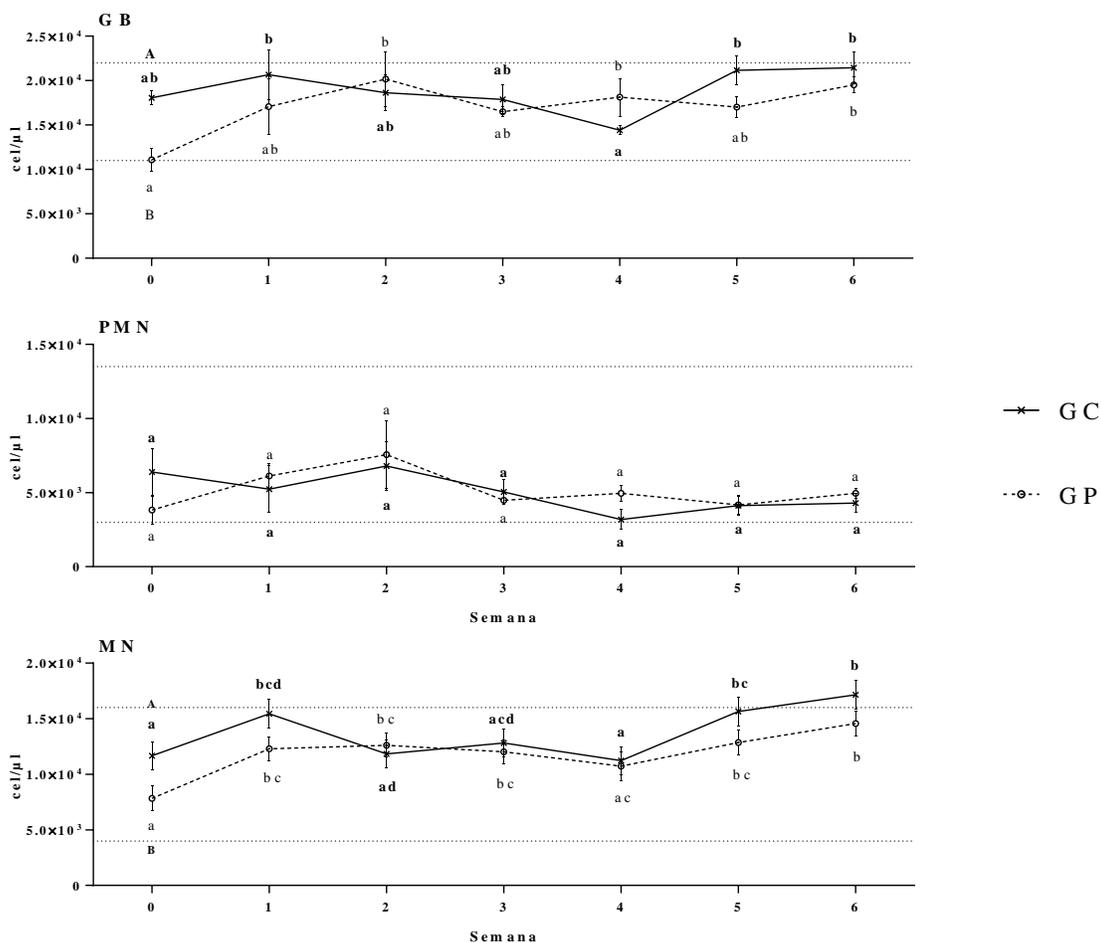


Figura 12. Evolución semanal de parámetros sanguíneos obtenidos del leucograma para cerdos del grupo control (GC) y grupo probiótico (GP).

Valores expresados en Media ± E.E. Las líneas punteadas indican el rango de valores normales en porcinos (Schalm's Veterinary Hematology 2010). GB: glóbulos blancos. PMN: células polimorfonucleares. MN: células mononucleares. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas en el tiempo dentro de cada grupo ($p < 0,05$) (negrita para GC, normal GP). Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre grupos en cada semana ($p < 0,05$).

Sumado a lo anterior, en la Figura 13 se muestra el comportamiento de las distintas líneas celulares. Allí puede notarse que el recuento de linfocitos presentó diferencias entre semanas tanto en el GC como en el GP ($p = 0,0135$ y $p = 0,0121$ respectivamente), pero en ningún momento fueron estadísticamente diferentes entre ellos ($p > 0,05$). Asimismo, el GP siempre estuvo dentro del rango de valores normales para dicho parámetro (excepto en la semana 6), mientras que el GC fue mayor al límite superior en las semanas 1, 5 y 6. Los valores de monocitos variaron en el tiempo solo en el GC ($p = 0,0066$) y se observaron

diferencias entre grupos para la semana 1 ($p= 0,0029$), donde el GC quedó fuera del rango de valores normales al presentar su valor más bajo.

Los recuentos de neutrófilos, basófilos y eosinófilos no mostraron cambios a lo largo del tiempo y tampoco diferencias entre grupos. Las tres líneas celulares se encontraron siempre dentro del rango esperado para cerdos. Si se analizan en detalle los valores de basófilos, puede notarse que para el GP durante todas las semanas la mediana fue de cero cel/ μ l, lo mismo sucede en el GC, excepto en la semana 2, donde la mediana fue 97 cel/ μ l. En cuanto a eosinófilos, puede decirse que la mayoría de los animales presentaron recuentos inferiores a la media (excepto para el GC en la semana 5, que fue mayor), ya que la mediana muestra menores valores.

En la Figura 13 también se muestra el Índice N/L. Dado que no se encontraron diferencias en los recuentos de neutrófilos y linfocitos, ni entre semanas ni entre grupos, tampoco las hubo en dicho indicador.

3.3.2 Bioquímica sanguínea

Los resultados de los metabolitos medidos en suero y plasma en las semanas 0, 1, 3 y 6 se encuentran graficados en la Figura 14. Como puede apreciarse allí, el calcio, el fósforo, la fosfatasa alcalina, como así también los triglicéridos se mantuvieron constantes en todo el experimento ($p > 0,05$), y no se encontraron diferencias entre grupos en ninguno de los momentos medidos. En cuanto a los resultados de colesterol, en el GC no hubo variación en el tiempo. Sin embargo, los valores hallados para el GP sí mostraron diferencias en las distintas semanas muestreadas ($p= 0,0150$), los valores fueron similares para las semanas 0, 1 y 6 diferenciándose la semana 3, momento en que se encontró el mayor valor promedio. A su vez, se apreciaron diferencias entre grupos en las semanas 0 y 6 ($p=0,0321$), siendo superior el GC en ambos momentos.

Cabe aclarar que los promedios de todas las variables medidas estuvieron dentro del rango de valores normales propuesto para la especie porcina (Egeli et al., 1998; Perri et al., 2017).

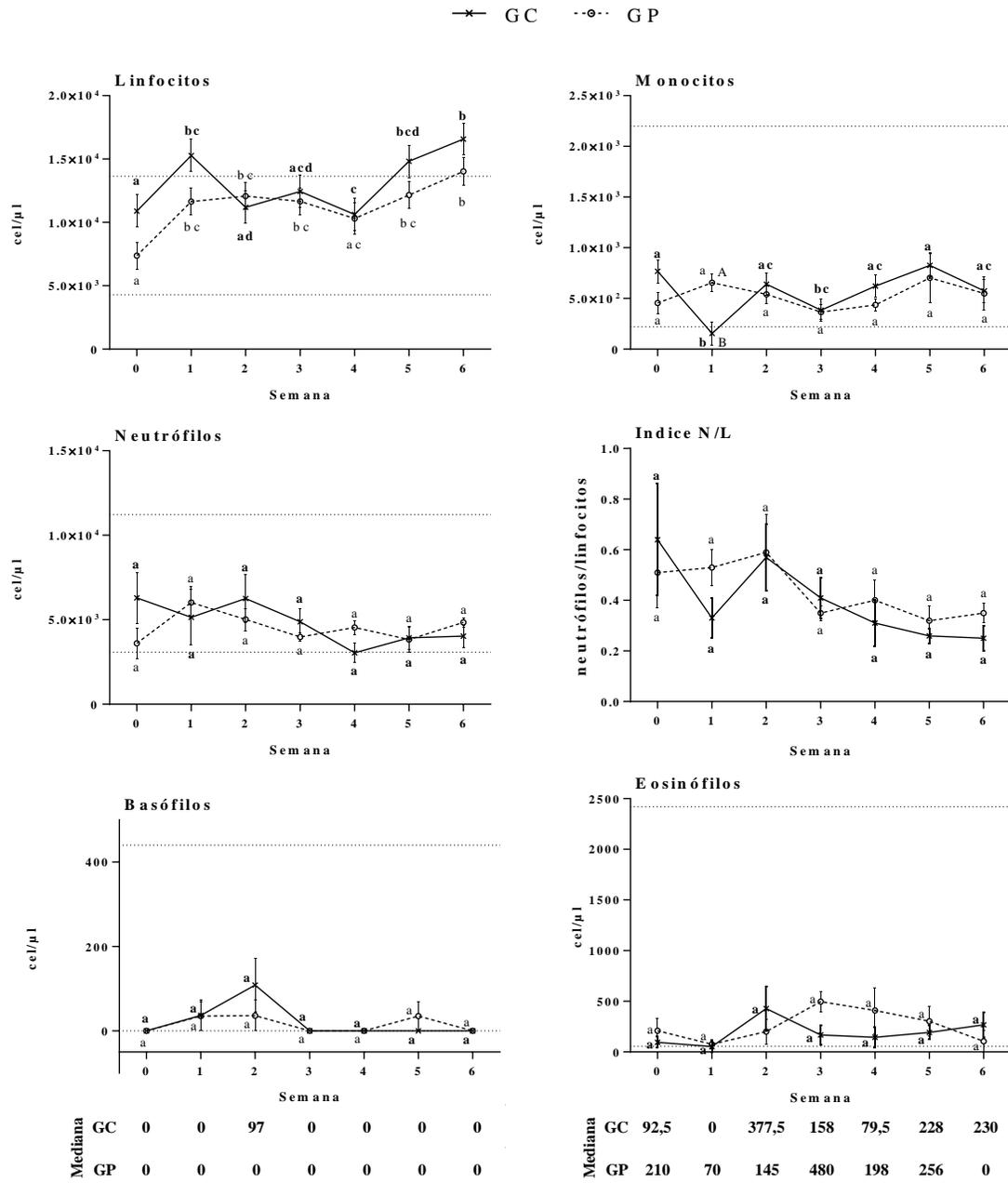


Figura 13. Evolución semanal de parámetros sanguíneos obtenidos del leucograma para cerdos del grupo control (GC) y grupo probiótico (GP). Valores expresados en Media± E.E. Para basófilos y eosinófilos además, se presentan valores de mediana. Las líneas punteadas indican el rango de valores normales en porcinos (Schalm's Veterinary Hematology 2010). Índice N/L: relación de neutrófilos y linfocitos. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas en el tiempo dentro de cada grupo ($p < 0,05$) (negrita para GC, normal GP). Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre grupos en cada semana ($p < 0,05$).

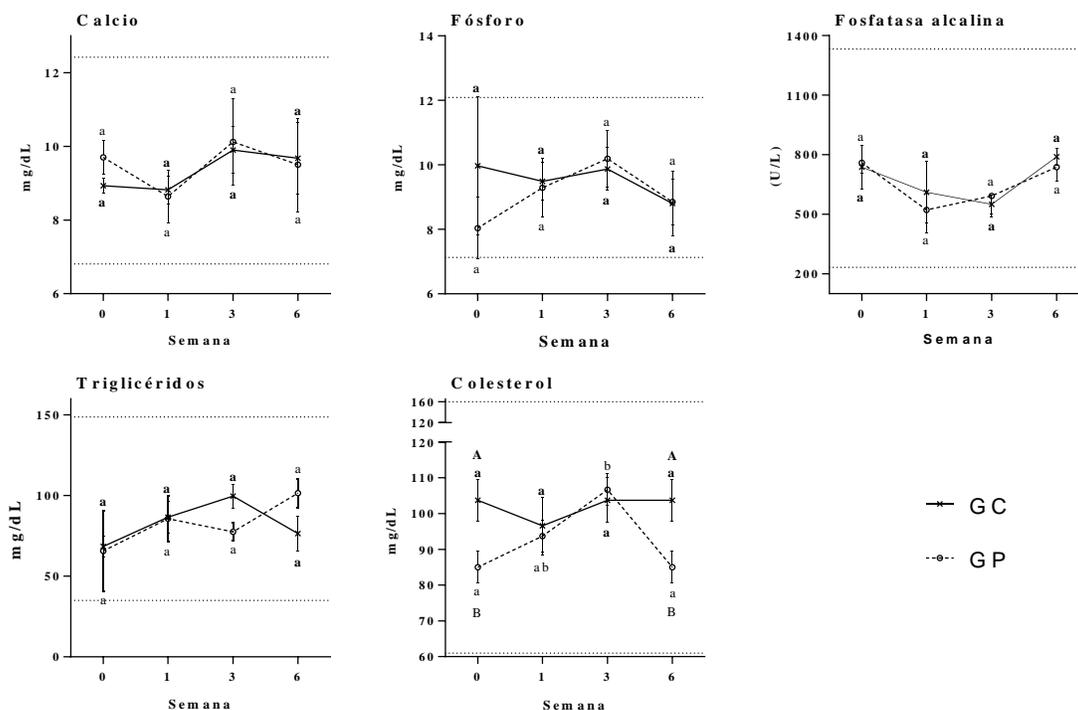


Figura 14. Evolución semanal de los niveles de calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, triglicéridos y colesterol en sangre de cerdos del grupo control (GC) y grupo probiótico (GP).

Valores expresados en Media± E.E. Las líneas punteadas indican el rango de valores normales en porcinos (Perri et al., 2017; Egeli et al., 1998). Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas en el tiempo dentro de cada grupo ($p < 0,05$) (negrita para GC, normal GP). Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre grupos en cada semana ($p < 0,05$).

3.4 Indicadores productivos

En lo que respecta a la evolución del PV en el tiempo (Figura 15) no se encontraron diferencias significativas en la interacción Semana*Grupo ($p = 0,9677$) ni en la comparación entre grupos ($p = 0,0987$). En este sentido, al contrastar PVf de ambos grupos (GC= 73,5 kg y GP= 70,5 kg) tampoco se identificaron diferencias significativas ($p = 0,4055$).

Al evaluar CMD y GMD (Cuadro 13), la interacción Semana*Grupo resultó significativa en ambos indicadores ($p = 0,0324$ y $0,0413$ respectivamente). El CMD del GC tendió a ser mayor durante todo el experimento, habiendo diferencias significativas con el GP solo en las semanas 1, 3 y 6. En cuanto a la GMD, se encontró una diferencia en la semana 4, momento en que el GP tuvo un valor superior al GC.

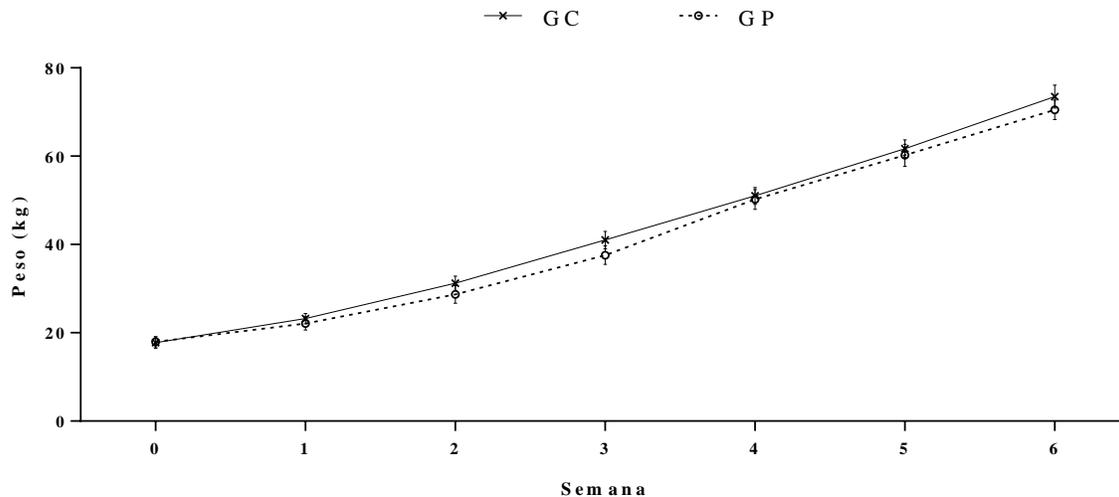


Figura 15. Evolución semanal del peso vivo promedio (\pm error estándar) por unidad experimental. GC: grupo control. GP: grupo probiótico.

Cuadro 13. Consumo medio diario y ganancia media diaria para el GP y GC en cada semana del estudio

Semana	CMD (kg/día/jaula)				GMD (kg/día/jaula)			
	GC	GP	E.E.	p-valor (semana*tratamiento)	GC	GP	E.E.	p-valor (semana*tratamiento)
1	0,69 a	0,57 b	0,03	0,0324	0,54 a	0,41 a	0,1	0,0413
2	1,29 c	1,23 c	0,09		1,00 b	0,83 b	0,1	
3	2,31 e	1,72 d	0,17		1,40 c	1,27 c	0,1	
4	2,73 e	2,49 e	0,19		1,43 c	1,80 d	0,1	
5	2,54 e	2,55 e	0,05		1,78 d	1,67 d	0,1	
6	3,27 f	2,86 e	0,08		1,97 d	1,72 d	0,1	

Medias ajustadas. CMD: consumo medio diario expresado en kg por día por jaula. GMD: ganancia media diaria expresada en kg por día por jaula. GC: grupo control; GP: grupo probiótico; E.E: error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas por fila ($p < 0,05$).

En el Cuadro 14 se puede apreciar que la CA promedio, arrojó un menor valor en el GP respecto al GC ($p = 0,0476$).

Cuadro 14. Conversión alimenticia para GC y GP

	CA media	Mediana	p-valor
GC	1,57 \pm 0,02 a	1,57 \pm 0,04	0,0476
GP	1,47 \pm 0,03 b	1,52 \pm 0,08	

GC: grupo control. GP: grupo probiótico. CA: conversión alimenticia expresada en kg de alimento consumido/kg de peso aumentado. Valores expresados en medias \pm error estándar y mediana \pm rango intercuartílico. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El consumo total de alimento y el aumento de peso total no presentaron diferencias entre grupos (GC: 87,32 kg vs GP: 77,45, $p= 0,0556$; GC; 55,70 kg vs GP: 52,52 kg, $p= 0,2222$ respectivamente) (Figura 16).

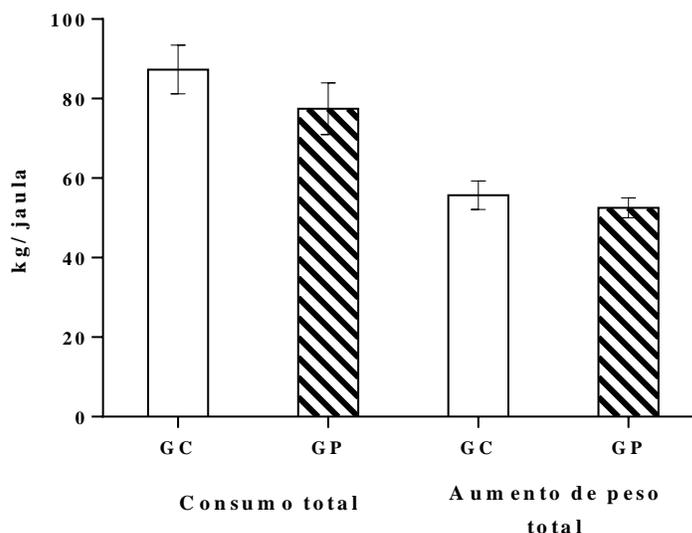


Figura 16. Consumo de alimento total y total de kilogramos ganados por jaula en todo el período experimental. GC: grupo control. GP: grupo probiótico.

3.5 Morfología intestinal

En lo que respecta a la morfología del intestino delgado de los cerdos bajo estudio, en el Cuadro 15 se pueden apreciar los resultados obtenidos. Como se indica allí, las vellosidades medidas en duodeno fueron de mayor longitud para el GP respecto al GC (0,330 vs 0,250 mm). A pesar de que no se encontraron diferencias en la profundidad de las criptas entre ambos grupos, la relación V/C del GP resultó mayor que la del GC (GP: 1,33 vs GC: 0,85 mm).

Los resultados hallados en yeyuno e íleon, muestran una tendencia a tener mayor longitud de las vellosidades en el GP. La profundidad de las criptas y la relación V/C fue similar en ambos grupos.

En la figura 17 se muestran, a modo de ejemplo, algunas imágenes de los cortes de intestino obtenidas para ambos grupos experimentales.

Cuadro 15. Altura de vellosidades y profundidad de criptas en intestino delgado de lechones al finalizar la etapa de recría

	GC	GP	<i>p</i> -valor
Duodeno			
V (mm)	0,25± 0,02 a	0,33± 0,01 b	0,0005**
C (mm)	0,29± 0,02	0,27± 0,02	0,4427
Relación V/C	0,85± 0,05 a	1,33± 0,1 b	0,0002**
Yeyuno			
V (mm)	0,28± 0,01a	0,31±0,01b	0,0681*
C (mm)	0,19± 0,01	0,2± 0,01	0,4240
Relación V/C	1,64± 0,07	1,76± 0,20	0,5667
Íleon			
V (mm)	0,21± 0,01a	0,24± 0,01b	0,0941*
C (mm)	0,21± 0,01	0,23± 0,02	0,2631
Relación V/C	1,07± 0,06	1,16± 0,11	0,4332

GC: grupo control. GP: grupo probiótico. V: altura de vellosidades medidas en milímetros. C: profundidad de criptas medidas en milímetros. Relación V/C: relación entre altura de vellosidades y profundidad de las criptas. Valores expresados en medias ± error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas (* $p < 0,10$; ** $p < 0,05$).

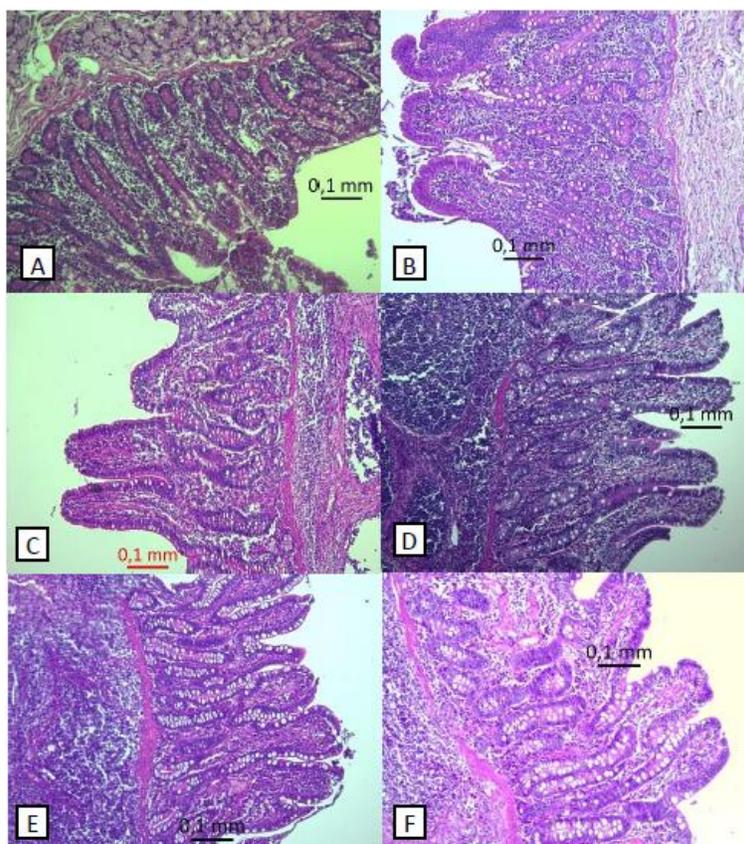


Figura 17. Cortes histológicos de intestino de cerdos del grupo control (GC) y grupo probiótico (GP) teñidos con hematoxilina-eosina.

A) Duodeno GC; B) Duodeno GP; C) Yeyuno GC; D) Yeyuno GP; E) Íleon GC; F) Íleon GP.

4 DISCUSIÓN

4.1 Microbiota

4.1.1 Recuento de poblaciones microbianas

El balance y la estabilidad de la microbiota intestinal son factores importantes en el mantenimiento de la homeostasis del huésped. Las condiciones que predisponen a enfermedades intestinales están a menudo relacionadas con un disturbio en la comunidad microbiana del intestino. Incluso en un animal saludable con su microbiota normal y en equilibrio, se encuentran grupos menores de MO patógenos y oportunistas, y su presencia no significa necesariamente que vaya a desarrollarse alguna enfermedad, ya que sus efectos patogénicos son controlados por el metabolismo de la microbiota equilibrada (Baidoo et al., 2005; Liao & Nyachoti, 2017). Por ende, un estrés, como el generado por el destete de los cerdos, ocasiona entre otras cosas un desbalance en dichas comunidades microbianas, dando la oportunidad a los patógenos presentes de aumentar sus poblaciones, pudiendo desarrollar enfermedades y efectos adversos sobre los animales.

Podría decirse entonces, que el estado de salud de un animal está estrechamente relacionado con el equilibrio entre MO benéficos y patógenos (Dowarah *et al.*, 2016). En muchos estudios se ha reportado que las BAL tienen la capacidad de inhibir patógenos en el TGI de distintas especies animales (Messaoudi et al., 2012; Dowarah et al., 2017; Vieco-Saiz et al., 2019). En este sentido un estudio *in vitro* realizado con 13 cepas de BAL indicó que *L. salivarius* DSPV014C tuvo valores de autoagregación que indicarían una alta potencialidad de la cepa para adherirse a las paredes intestinales y allí competir con diferentes patógenos por los sitios de fijación (Bertozzi, 2012). Además, consideró como rápido el tiempo de coagregación (30 min) con *Salmonella dublin* DSPV 595 y *E. coli* DSPV 247T, indicando que dicha cepa podría tener actividad frente a patógenos *in vivo*. Sumado a lo anterior *L. salivarius* DSPV014C fue, del total de las cepas estudiadas por Bertozzi (2012), una de las que generó mayor inhibición en las especies de salmonella utilizadas.

El hecho de que *L. salivarius* DSPV014C resistente a rifampicina haya sido encontrado en el GP a partir de la semana 1 de estudio y en todas las siguientes, indica su capacidad de resistir al medio ácido estomacal y a la bilis, lo que concuerda con los resultados que reporta Bertozzi en 2012. Sin embargo, a pesar de que la cepa fue capaz de

llegar al intestino, donde está su sitio de acción, no se vieron diferencias entre grupos en los recuentos semanales de poblaciones de *E. coli*, como era de esperarse según lo observado *in vitro*. Esto último concuerda con un estudio realizado por Zhang et al. (2010), donde al suministrar una cepa *L. rhamnosus* a un grupo de lechones en posdestete no se encontraron diferencias en el recuento de bacterias coliformes. Sin embargo, luego de desafiar a los animales con *E. coli* K88 las diferencias entre grupos en el recuento de coliformes se hicieron evidentes.

Ante esta perspectiva, los recuentos similares de *E. coli* entre grupos en el presente estudio podrían explicarse por el hecho de haber mantenido las condiciones de crianza adecuadas para los cerdos durante todo el experimento, lo que ayuda a mantener la microbiota intestinal balanceada y fomenta el buen estado sanitario (Blajman et al., 2017; Zimmerman, 2020).

Los cerdos poseen una población permanente de levaduras en el TGI (Canibe et al. 2001), y su suplementación como probióticos ha sido reportada por varios autores. En una revisión bibliográfica, Shurson (2017) enumera entre otros beneficios asociados al uso de dichos MO en cerdos, una mejora en el balance de la microbiota en el TGI, la participación en la maduración de tejidos del TGI, la modulación de la respuesta inmune, la reducción de diarreas en el posdestete y mejoras en la tasa de crecimiento y la CA.

A pesar de que se conoce que las BAL producen ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico (Jin et al., 2000), y se ha registrado que dicho producto estimula el crecimiento de levaduras (Maribo et al., 2000), en este estudio no se observaron diferencias entre grupos en el recuento de levaduras a partir de MF.

Normalmente el recuento de BAL totales en heces porcinas toma valores de entre 7,0 y 9,0 log UFC/gr de MF (Chang et al. 2001), lo que coincide con los valores encontrados para ambos grupos en el presente estudio. Para esta población microbiana, se vio una diferencia en la semana 1, siendo mayor el recuento en el GP, coincidiendo con el inicio de la suplementación de *L. salivarius*. En las semanas subsiguientes los valores para ambos grupos fueron similares, efecto que podría explicarse por una reducción de otras BAL del TGI, desplazadas por *L. salivarius* DSPV014C, permaneciendo estable la población de BAL totales (Zimmermann, 2020). Esto se sustenta, además, con los resultados obtenidos de la relación entre *L. salivarius* DSPV014C y BAL totales, que se mantuvo estable a partir

de la segunda semana ($p= 0,0721$). En este sentido la diferencia encontrada en la semana 1 para la relación BAL/Levaduras, en favor del GP, también se explicaría por el inicio de la suplementación con la cepa probiótica.

Campylobacter termotolerantes es un grupo de especies bacterianas patógenas que producen enfermedades de transmisión alimentaria en humanos y, asimismo, son consideradas comensales en el TGI de animales de granja (Ruiz et al., 2020), a los que también pueden causarles enfermedades. Por lo tanto, son considerados patógenos oportunistas (Svartstrom et al., 2013; Ling et al. 2016). Los resultados de este estudio solo mostraron diferencias entre grupos para la semana 3, donde el GP tuvo mayores recuentos que el GC. En el resto de las semanas muestreadas los valores de ambos grupos fueron similares, coincidiendo con lo encontrado por Wang et al. (2019) cuando suministraron *L. plantarum* a lechones en postdestete. Por el contrario, Ruiz et al. (2020) en un estudio con ratones encontraron diferencias en el recuento de *Campylobacter termotolerantes* en heces luego de suministrar *L. plantarum* como probiótico. Cabe aclarar que estos últimos autores realizaron un desafío sanitario con la especie patógena en cuestión. En síntesis, la falta de diferencias en el recuento de este MO, nuevamente podría explicarse por la buena condición sanitaria de los animales en todo el período experimental.

Por otro lado, se observaron variaciones semanales en el recuento de todas las poblaciones microbianas estudiadas, que estarían dadas por cambios fisiológicos propios del crecimiento del cerdo, los que fueron acompañados con un cambio en la alimentación, según los requerimientos nutricionales (Stoppani et al. 2020).

4.1.2 Dinámica poblacional de la microbiota predominante

4.1.2.1 Perfil obtenido a partir de la DGGE

El análisis de los perfiles obtenidos a partir de la DGGE permitió observar una diferencia entre los grupos experimentales en cuanto a la modulación de la microbiota. Cuando se observan los perfiles de cada grupo por separado teniendo en cuenta todas las semanas, podría decirse que la evolución de la microbiota en el GC no presentó un patrón marcado, algo que si puede notarse en el GP, donde si bien la semana 0 y la 3 están en un mismo cluster, las muestras de la semana 6 se encuentran separadas.

A su vez, el GP presentó valores mayores para los índices de diversidad y riqueza en la semana 3. Chen et al. (2017) indican que a pesar de la disminución en la diversidad microbiana del TGI después del destete, esta aumenta luego, mostrando incrementos hasta la adultez de los cerdos. Distintos autores explican que valores altos de diversidad podrían representar un beneficio para los cerdos en el posdestete dada la posible conexión entre la diversidad de los ecosistemas y su habilidad para responder a las perturbaciones (Hildebrand et al., 2013; Chen et al., 2017; Wang et al., 2019). En este sentido, el hecho de que el GP haya mostrado una mayor diversidad que el GC, podría darle una ventaja, dado que una alta diversidad bacteriana sería favorable para la salud en general y la productividad de los animales al permitir mantener la resiliencia, resistencia y estabilidad del microbioma luego de una situación estresante. Además, un mayor valor en dicho índice podría considerarse como signo de una microbiota con mayor madurez (Chen et al., 2017).

4.1.2.2 Caracterización taxonómica de la microbiota presente en la materia fecal

En general, la microbiota intestinal de los cerdos está compuesta por *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacterias*, *Actinobacterias* y *Cyanobacteria*; y la distribución de los distintos *phylum* es variable. Es decir, la disponibilidad de sustratos, las concentraciones de oxígeno, el pH y las interacciones entre MO, forman en conjunto nichos divergentes en las distintas secciones del TGI (Zhang et al., 2018). En este sentido, dado por su sensibilidad al pH, en los segmentos del TGI medianamente ácidos dominan los *Firmicutes* Gram positivos, mientras que los *Bacteroidetes* lo hacen en pH cercano a la neutralidad (Duncan et al., 2009). El marcado descenso en la concentración de oxígeno en el intestino grueso da como resultado una alta carga de MO anaerobios, como ser *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.* y otras especies dentro de la clase *Clostridia* (incluyendo *Ruminococcus spp.*, *Butyrovibrio spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Eubacterium spp.*, y *Peptostreptococcus spp.*) (Rastall, 2004; Albenberg et al., 2014). Por otro lado, los *Lactobacillus* y algunos *Clostridium* que poseen la enzima hidrolasa de sales biliares (BSH) para desconjugar los ácidos biliares se asocian al intestino delgado, donde abundan estos compuestos (Wahlström et al., 2016).

Los resultados de la secuenciación de la microbiota presente en la MF de los cerdos mostraron presencia de MO correspondientes a los *phylum Firmicutes*, *Bacteroidetes*,

Proteobacteria y *Synergistetes*, siendo dominantes los dos primeros. Esto está en concordancia con lo hallado por otros autores (Eckburg et al., 2005; Kim et al., 2011; Mach et al., 2015; Yang et al., 2020), quienes reportaron que más del 90% de las secuencias aisladas de lechones destetados correspondían a dichos *phylum*. Kim et al. (2011) atribuyen estos resultados a las condiciones estrictas de anaerobiosis que se presentan en el colon y a que la mayoría de los MO correspondientes a *Firmicutes* y *Bacteroidetes* son anaerobios. Por otro lado, Deusch et al. (2015) indican que los *Bacteroidetes* se asocian a la conversión de polisacáridos en oligosacáridos y los *Firmicutes* tienen mayor relación con los procesos de absorción y fermentación de monosacáridos. De esta manera, Zimmermann (2020) concluye que una comunidad microbiana que contenga dichos *phylum* podría darle una ventaja al animal en el aprovechamiento de carbohidratos.

Dentro del *phylum Bacteroidetes*, se encontró en el GC tanto en la semana 3 como en la 6 una banda compatible con la familia *Prevotellaceae*, con 91,28 % y 91,23 % de coincidencia respectivamente con *Prevotella sp.* Dicha especie posee la capacidad de producir enzimas (xilanasas, manasas y β -glucanasas) que degradan polisacáridos presentes en las paredes celulares de los cereales (Mach et al., 2015), por lo que su presencia podría estar explicada por la introducción de una dieta sólida basada en cereales.

En ambos grupos experimentales, hubo coincidencias con MO del *phylum Firmicutes*, con predominio de la clase *Clostridia*, y en general, relacionados con MO conocidos por producir butirato, teniendo un rol particular en el mantenimiento y la protección del epitelio del colon (Eckburg et al., 2005). La aparición de *Coprococcus sp.* y especies pertenecientes a las familias *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae*, MO predominantes en el intestino grueso, pueden asociarse con su gran capacidad para digerir carbohidratos complejos y producir ácidos grasos de cadena corta, los que reducen directamente el crecimiento de *Enterobacteriaceae* por una disminución del pH (Zhou et al., 2015; Zhang et al., 2018).

La muestra número 2, correspondiente a la semana 0, tuvo un 86,27 % de coincidencia con dos MO del orden *clostridiales*, pudiendo entonces corresponderse con un MO de la familia *Lachnospiraceae* o con *Blautia sp.* Esta última fue hallada en cerdos, y se cree que, cuando su población es abundante, podría tener un rol importante en la regulación de enfermedades metabólicas, inflamatorias y en la biotransformación (Liu et al., 2021).

Lactobacillus fue el único género encontrado dentro de la clase *Bacilli*, estando presentes en todas las semanas para el GP y sólo en la semana 6 para el GC. Esto coincide con lo enunciado por otros autores, quienes reportan que en lechones en posdestete, *Lactobacillaceae* fue la familia predominante dentro del *phylum Firmicutes* (Janczyk et al., 2007; Pieper et al., 2008; Aluthge et al., 2019)

La reducida proporción de MO pertenecientes a *Proteobacterias* (donde, por ejemplo, podemos encontrar *E. coli*) es un resultado esperable, ya que las especies facultativas pueden representar el 0,1% en ambientes estrictamente anaerobios como lo es el colon (Eckburg et al., 2005).

Cabe destacar, que la mayoría de las especies encontradas se corresponden con aislamientos realizados en cerdos.

Teniendo en cuenta que el método de DGGE sólo detecta entre 0,1 a 1 % de la composición microbiana total presente en el TGI, esta técnica permitió complementar los datos cuantitativos obtenidos de los recuentos en placa para conocer la microbiota dominante en los cerdos bajo estudio (Pieper et al., 2009; Fusari, 2020).

4.2 Score fecal

En las granjas de producción porcina se considera que la mayor mortandad de animales es ocasionada por la incidencia de diarreas causadas mayormente por *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y *Salmonella* (Liao & Nyachoti, 2017). Con respecto a esto, Dowarah et al. (2017), reportaron una disminución en la incidencia de diarrea en lechones tratados con *L. acidophilus*. Sin embargo, Sayan et al. (2018) en un estudio donde suministraron una cepa de *L. salivarius* vs un control negativo, solo encontraron diferencias en el score fecal e incidencia de diarrea entre tratamientos luego de desafiar a ambos grupos con *E. coli* F4, explicando dicho resultado por una modulación de la microbiota intestinal ligada al suministro del probiótico.

En el presente trabajo, los animales fueron monitoreados diariamente, observando y reconociendo la presencia de enfermedades o cualquier evento que pudiera ocurrir. En este sentido no se registraron afecciones de ningún tipo. En cuanto al score fecal no se encontraron diferencias entre los grupos experimentales, y en ambos, la mayoría de las

observaciones correspondieron al score fecal 0. Por otro lado, dada la ausencia de diferencias significativas, puede decirse que la chance de tener un score fecal 0, 1, 2 o 3 es independiente del grupo experimental.

Puesto que los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Sayan et al. (2018) previo a realizar el desafío sanitario, y a que no se evidenció ningún síntoma de enfermedad en los animales, estos podrían explicarse nuevamente, por la óptima condición sanitaria y de crianza que recibieron los cerdos durante todo el experimento.

4.3 Análisis en sangre

4.3.1 Eritrograma y leucograma

El perfil sanguíneo y bioquímico puede proveer evidencia significativa sobre la salud y el metabolismo de los animales (Perri et al., 2017; Dowarah et al., 2018). En este estudio, los valores de las variables medidas en sangre, en general estuvieron dentro de los rangos normales para cerdos en ambos grupos experimentales. Sin embargo, algunas no presentaron dicho comportamiento. La Hgb, el VCM y el Hto estuvieron por debajo del valor mínimo normal en los primeros muestreos, no obstante, con el correr de las semanas fueron aumentando hasta quedar dentro del rango óptimo. Esto no sucedió con los valores de HCM Y CHCM, que estuvieron debajo del nivel mínimo durante todo el experimento. Si bien estas variables podrían estar indicando anemia por deficiencia de hierro (Starzyński et al., 2013) esto se descartó dado que el resto de los indicadores estuvieron dentro de los valores normales. El hecho de que algunas variables se encuentran fuera de los rangos normales, podría deberse a que éstos, en general, son establecidos para animales adultos (Schalm's Veterinary Hematology 2010) y que, además, la HCM y la CHCM aumentan con la edad del cerdo (Friendship et al., 1984). Teniendo en cuenta esto, al comparar los valores obtenidos con los publicados por Ventrella et al. (2017) para cerdos de la misma edad y peso que en este estudio, hay una coincidencia para la primera semana de muestreo.

Algunos autores que estudiaron dichos parámetros luego de suministrar una cepa probiótica no encontraron diferencias (Chen et al. 2006; Herfel et al., 2013; Zhang et al., 2014, Lan et al., 2016, Dlamini et al., 2017). En el presente trabajo, coincidiendo con lo hallado por Fusari (2020), las variaciones observadas a lo largo del tiempo en los distintos

indicadores no pudieron relacionarse con la suplementación de *L. salivarius* dado que no se encontraron diferencias entre grupos o estas fueron aisladas: los GR y la Hgb fueron mayores para el GC en la semana 5.

En cuanto a los parámetros del leucograma, los resultados hallados en la bibliografía también son variables. Por un lado, algunos estudios indican una reducción en el recuento de linfocitos y células MN luego del suministro de *L. reuteri* (Fusari, 2020; Zimmerman, 2020). Burdick-Sanchez et al. (2018) en un estudio realizado con lechones suplementados con un producto de la fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* y desafiados con lipopolisacáridos provenientes de *E. coli*, reportan una reducción de GB, neutrófilos, linfocitos y en la relación N/L en los animales tratados luego del desafío, lo que sugiere que dichos cerdos tenían un sistema inmune mejor preparado y necesitaron menos células del sistema inmune para sobrellevar la infección. Además, enuncian como una posible explicación de este hecho que la reducción de GB en circulación periférica es el resultado de la translocación de células de inmunidad al TGI dado por la estimulación del probiótico, o bien, es el resultado de una microbiota intestinal más estable lo que iría de la mano de una mejor salud intestinal y por ende una reducción tanto de la inflamación como de GB (Shen et al., 2011; Burdick-Sanchez et al., 2018). Sin embargo, otros autores señalan un aumento en la concentración de linfocitos en cerdos suplementados con probiótico bajo un desafío sanitario y atribuyen este resultado a la capacidad de la cepa probiótica utilizada de estimular el sistema inmune (Upadhaya et al., 2017).

Este estudio pretendió evaluar si *L. salivarius* es capaz de modificar características en la sangre de los cerdos. En este sentido, sólo se encontraron diferencias entre grupos para algunos parámetros en momentos puntuales (GB: semana 0 y monocitos: semana 1), por lo que no podrían ser atribuibles al consumo de la cepa bacteriana utilizada. Además, todas las variables correspondientes a la serie leucocitaria estuvieron dentro del rango normal para la especie porcina. De esta forma los resultados coinciden con Lan et al. (2016) y Min et al. (2019), quienes tampoco encontraron diferencias ni en GB ni en linfocitos al suplementar con un probiótico multicepa, adjudicando dichos resultados a la ausencia de enfermedades en los animales de ambos grupos, ya que generalmente los indicadores sanguíneos que muestran efectos inmunitarios no cambian en cerdos en óptimas condiciones sanitarias, de alimentación y alojamiento (Min et al., 2019).

4.3.2 Bioquímica sanguínea

La especie animal, el sexo y particularmente la dieta están involucrados y frecuentemente relacionados en la regulación del colesterol sérico (Wilson et al., 1972). En diversas investigaciones se han reportado cambios en los niveles de colesterol en cerdos luego de la suplementación con probióticos. Por ejemplo, un estudio con cerdos hipercolesterolémicos inducidos demostró que cuando los animales fueron suplementados con una cepa de *L. acidophilus* por 15 días, la reducción del colesterol total en sangre fue de 11,8 % respecto al control (De Rodas et al., 1996).

En el organismo, los niveles de colesterol son el resultado de mecanismos de retroalimentación entre las vías endógenas y exógenas de su metabolismo. De esta manera, una reducción en la entrada de colesterol intestinal dado por una inhibición de su absorción, aumenta la actividad enzimática para la síntesis de dicha molécula. Por el contrario, una absorción intestinal alta de colesterol inhibe la enzima precursora para su síntesis, reduciendo su producción en hígado y aumentando las concentraciones plasmáticas (Maldonado-Saavedra et al., 2012). Por otro lado, un 50 % del colesterol sintetizado en el organismo es convertido en ácidos biliares, los que se eliminan por la bilis en forma de sales biliares. Cumplida su función en el intestino las sales pierden sus aminoácidos, regresando al hígado los ácidos biliares. Cuando esta absorción es buena, se inhibe su síntesis *de novo* (Osio, 1992).

En este sentido se han propuesto distintos mecanismos por los cuales un probiótico podría reducir la concentración de colesterol. Una de ellas es la disminución de la absorción en el intestino delgado dada por la incorporación del colesterol en las membranas celulares por parte del probiótico (Pigeon et al., 2002). Liong & Shah (2005) a partir de un estudio *in vitro*, reportaron que *L. acidophilus* pudo remover el colesterol de su medio de cultivo, no solo por asimilación sino también fijándolo a la superficie celular, lo que fue evidenciado tanto en células vivas como muertas.

Otro mecanismo propuesto implica la capacidad de ciertas cepas probióticas de desconjugar enzimáticamente las sales biliares por medio de la enzima BSH. La actividad de la BSH ha sido detectada tanto en *Lactobacillus* como en *Bifidobacterias spp.* (Liong & Shah, 2005). Las sales biliares conjugadas se absorben con rapidez en el TGI debido a su gran hidrofiliidad, mientras que las sales biliares libres son menos solubles y se absorben

en menor proporción lo que aumenta su excreción en la MF. Esto incrementaría la necesidad de síntesis de nuevas sales biliares y puesto que el colesterol es precursor para la síntesis *de novo* de dichas sales, su demanda generaría un descenso de la concentración de colesterol en sangre (Lye et al., 2009).

En este estudio se encontraron diferencias entre grupos en los resultados de colesterol en favor del GP. Los valores menores de la semana 6 podrían estar relacionados con el consumo de *L. salivarius*, pero debido a que las diferencias también se observaron en la semana 0, no podría aseverarse lo dicho anteriormente. Probablemente, la duración del estudio no fue suficiente para evidenciar el efecto de *L. salivarius* sobre la concentración de colesterol en sangre.

4.4 Indicadores productivos

Teniendo en cuenta que la alimentación de los cerdos representa alrededor del 60 % del total de los costos de producción en las granjas de nuestro país (Arrieta et al., 2015), trabajar con una eficiencia alimenticia óptima es crítico para lograr la mejor rentabilidad en la producción porcina (Patience, 2012). Para alcanzar dicho objetivo sería necesario mejorar el uso de los nutrientes aportados por la dieta, lo que está fuertemente asociado a la salud del TGI (Liao & Nyachoti, 2017). Es decir, solo un TGI saludable puede tener una mejor digestión del alimento y absorber una mayor cantidad de nutrientes a través del epitelio (Ewing, 2008; Willing et al., 2012).

En coincidencia con los resultados reportados por Dowarah et al. (2017), en el presente estudio no se encontraron diferencias en el PVf entre grupos, pero sí se hallaron diferencias para GMD y CMD. La mayor GMD en la semana 4 para el GP coincide con lo reportado por otros autores, quienes vieron una mayor GMD en lechones suplementados con distintas cepas probióticas (*L. acidophilus*, *P. acidilatici*, *L. reuteri* y *L. salivarius*) respecto a un control (Yu et al., 2008; Thu et al., 2011; Dowarah et al., 2017; Yang et al., 2020).

Al mismo tiempo, y en concordancia con los resultados de este estudio, Dowarah et al. (2017) y Suo et al., (2012) comunican un menor CMD por parte de los animales tratados con las cepas probióticas durante la fase de recría. Y, por ende, reportan una mejora en la CA de dichos grupos, suponiendo entonces que los animales suplementados con

probióticos pudieron sobreponerse al estrés generado por el destete y mostraron mejores valores en los parámetros de crecimiento.

Según los resultados obtenidos en esta investigación, puede decirse que los cerdos del GP alcanzaron un PVf similar al GC consumiendo menos alimento, por lo que se obtuvo una mejora en la CA. Esto podría explicarse por la producción de ácido láctico y enzimas proteolíticas por parte de las BAL suministradas como probiótico, la mayor concentración de ácidos orgánicos en TGI daría como resultado un menor pH, lo que puede asociarse a una mejora en la digestión de nutrientes en el TGI (Canibe et al., 2001; Lyberg et al., 2006; Yu et al., 2008; Giang et al., 2010). Sumado a lo dicho, Zhao & Kim (2015) hallaron que los cerdos que consumieron *L. reuteri* y *L. plantarum* tuvieron una mejora en la digestibilidad aparente tanto del nitrógeno como de la energía bruta, atribuyendo estos resultados a lo hallado por De Champs et al. (2003) quienes expresan que los *Lactobacillus* pueden sobrevivir en TGI en humanos cuando son suministrados diariamente en concentraciones de entre 10^9 y 10^{10} UFC. De esta manera, favorecen la exclusión de patógenos del epitelio, el equilibrio de la microbiota y la digestibilidad de los nutrientes. Además, un aumento en la cantidad de *Lactobacillus* podría incrementar la actividad de ciertas enzimas, como la β -galactosidasa, que tienen un efecto positivo en la utilización de los nutrientes por parte del huésped (Fuller, 1989).

En cuanto a la diferencia encontrada para la CA, algunos autores enuncian que los compuestos que promueven el crecimiento se vuelven más efectivos a medida que se exacerbaban los desafíos ambientales y nutricionales que enfrenta el animal (Madec et al., 1998; Cromwell, 2000).

4.5 Morfología intestinal

La mayor absorción de nutrientes y, por ende, la obtención de mejores resultados en parámetros de crecimiento podría estar explicado por un aumento en la longitud de las vellosidades intestinales (Liu et al., 2014) y una mejora en la relación V/C. Durante el posdestete, en general, los animales experimentan una atrofia en la morfología del intestino delgado, es decir, un acortamiento de las vellosidades y una hiperplasia de las criptas, lo que puede limitar la absorción de nutrientes y la ganancia de peso en la etapa de recría (Hedemann et al., 2003).

En el presente estudio, la longitud de las vellosidades intestinales en todos los segmentos muestreados fue mayor para el GP; y en duodeno, además, hubo una mejora en la relación V/C. Esto coincide con lo reportado por Sayan et al. (2018), quienes obtuvieron mayores alturas en las vellosidades de los tres segmentos del intestino delgado al suplementar cerdos con una cepa de *L. salivarius*, adjudicando este resultado a la capacidad de los *Lactobacillus* de producir ácidos grasos de cadena corta que estimulan las células epiteliales y los enterocitos, y permiten aumentar la altura de las vellosidades. Sin embargo, Suo, et al., (2012) a pesar de observar mejoras en el largo de las vellosidades y la profundidad de las criptas en todas las porciones de intestino, luego de suministrar *L. plantarum* como cepa probiótica, no pudieron asociarlo a una mayor concentración de ácidos grasos de cadena corta, y enuncian que podría haber otros mecanismos por los que los probióticos favorezcan dichos parámetros. En este sentido explican que tanto *Lactobacillus spp.* como *Bifidobacterium spp.* producen ciertos factores proteínicos que tienen la capacidad de alterar directamente la permeabilidad de las membranas intestinales (Madsen et al., 2001).

Por otro lado, una mejora en la relación V/C para duodeno indicaría un aumento de la superficie de absorción en una sección del intestino donde ocurre una gran absorción de nutrientes (Moturi et al., 2021).

5 CONCLUSIONES GENERALES

- *L. salivarius* DSPV014C resistente a rifampicina fue capaz de alcanzar el intestino, donde ejerce su acción probiótica.
- *L. salivarius* DSPV014C produjo una modulación de la microbiota intestinal en el GP diferente al GC, generando valores mayores para los índices de diversidad y riqueza en el primer grupo.
- En ambos grupos hubo presencia de MO correspondientes a los phylum *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Synergistetes*, siendo dominantes los dos primeros.
- La suplementación con *L. salivarius* DSPV014C mejoró la CA de los cerdos en etapa de recría.
- El consumo de *L. salivarius* DSPV014C mejoró la altura de las vellosidades intestinales y la relación V/C.

En conclusión, podría decirse que la suplementación con *L. salivarius* DSPV014C produjo una mejora en el desempeño productivo de los cerdos del GP, lo que se explicaría por un incremento en la capacidad de digestión y absorción dadas por una mayor longitud de vellosidades intestinales y una modulación diferencial de la microbiota intestinal, con mayores índices de riqueza y diversidad.

Sin embargo, no pudieron demostrarse todos los aspectos planteados en la hipótesis propuesta, especialmente lo que confiere a la aparición de diarreas. Esto podría deberse a que los animales se mantuvieron siempre en óptimas condiciones sanitarias. En este sentido sería recomendable realizar estudios en condiciones de desafío para lograr validar los efectos probióticos de *L. salivarius* DSPV014C.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup, F.M. 2004. Monitoring of Antimicrobial Resistance Among Food Animals: Principles and Limitations. *Journal of Veterinary Medicine*, B 51, 380–388.
- Albenberg, L., Esipova, T.V., Judge, C.P., Bittinger, K., Chen, J., Laughlin, A., et al. 2014. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology* 147, 1055–63.e8.
- Aluthge, N.D., van Sambeek, D.M., Carney-Hinkle, E.E., Li, Y.S., Fernando, S.C., Burkey, T.E. 2019. Board invited review: The pig microbiota and the potential for harnessing the power of the microbiome to improve growth and health. *Journal of Animal Science*, Volume 97, Issue 9, September 2019, Pages 3741–3757
- Arrieta, J., Lescano, D., Mirada, M., Vitale, L., Felicioni, E., Vaudagna, J. 2015. Estrategias nutricionales y de alimentación en recría y engorde. Impacto en los costos. *Ferocado* 2015. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Marcos Juárez.
- Baidoo, S.K., Ariza-Nieto, C., 2005. Enhancing intestinal function of monogastric. Allen D. Lemay Swine Conference.
- Bertozi, E. 2012. Selección de microorganismos indígenas mediante pruebas in vitro, para mejorar el estado sanitario y la performance de crecimiento durante la crianza intensiva de cerdos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. pp 117.
- Blajman, J.E., Olivero, C.A., Fusari, M.L., Zimmermann, J.A, Rossler, E., Berisvil, A.P., Romero Scharpen, A., Astesana, D.M., Soto, L.P., Signorini, L.M., Zbrun, M.V., Frizzo, L.S. 2017. Impact of lyophilized *Lactobacillus salivarius* DSPV 001P administration on growth performance, microbial translocation, and gastrointestinal microbiota of broilers reared under low ambient temperature. *Reserch in Veterinary Science* 114 (2017) 388-394.
- Burdick-Sanchez, N.C., Carroll, J.A., Broadway, P.R., Bass, B.E., Frank, J.W. 2018. Modulation of the acute phase response following a lipopolysaccharide challenge in pigs supplemented with an all-natural *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product. *Livestock Science*. 208:1-4.
- 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

- Canibe, N., Steien, S. H., Øverland, M., Jensen, B. B. 2001. Effect of K-diformate in starter diets on acidity, microbiota, and the amount of organic acids in the digestive tract of piglets, and on gastric alterations. *Journal of Animal Science* 2001. 79:2123–2133
- 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* 2001; 80:193e9
- Chen, L., Xu, Y., Chen, X., Fang, C., Zhao, L., Chen, F. 2017. The maturing development of gut microbiota in commercial piglets during the weaning transition. *Frontiers in Microbiology* 8:1688.
- Chen, Y.J., Min, B.J., Cho, J.H., Kwon, O.S., Son, K.S., Kim, I.H., Kim, S.J. 2006. Effects of dietary *Enterococcus faecium* SF68 on growth performance nutrient digestibility blood characteristics and faecal noxious gas content in finishing pigs. *Asian Australas. Journal of Animal Science*. 19: 406–411
- Cho, I.J., Lee, N.K., Hahm, Y.T. 2009. Characterization of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of breast-feeding piglets. *Journal of bioscience and bioengineering* 2009; 108(3):194e8
- Corr, S.C., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C., Gahan, C.G., 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 7617-7621.
- Cromwell, G.L. 2000. Antimicrobial and promicrobial agents. P: 401-426 in *Swine Nutrition*. 2nd ed. A.J. Lewis and L.L. Southern, ed CRC Press, Washington, DC.
- De Champs, C., Maroncle, N., Balestrino, D., Rich, C., Forestier, C., 2003. Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35, after oral consumption. *Journal of clinical microbiology*. 41, 1270–1273.
- De Man, J.D., Rogosa, M., Sharpe, M.E. 1960. A médium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of applied microbiology*. 23: 130 - 135.
- De Rodas, B.Z., Gilliland, S.E., Maxwell, C.V. 1996. Hypocholesterolemic action of *Lactobacillus acidophilus* ATCC and calcium in swine with hypercholesterolemia induced by diet. *Journal of dairy science* 1996, 79, 2121-2128.

- De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W.B. (Eds.). 2011. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (Vol. 3)*. Springer Science & Business Media. ISBN: 978-0-387-95041-9
- Demecková, V., Kelly, D., Coutts, A.G.P., Brooks, P.H., Campbell, A. 2002. The effect of fermented liquid feeding on the faecal microbiology and colostrum quality of farrowing sows. *International Journal of Food Microbiology*. 79: 85-97.
- Deusch, S., Tilocca, B., Camarinha-Silva, A., Seifert, J., 2015. News in livestock research – use of omics- technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 13:55-63
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, C. W. 2012. *InfoStat versión 2012*. Córdoba, Ar, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- Dlamini, Z.C., Aiyegoro, O.A., Okoh, A.I. 2017. Effects of probiotics on growth performance blood parameters and antibody stimulation in piglets. *South African Journal of Animal Science* 47 (No. 6)
- Dowarah, R., Verma, A. K., Agarwal, N. 2016. The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review. *Animal Nutrition* (2016).
- Dowarah, R., Verma, A. K., Agarwal, N., Patel, B.H.M., Singh, P. 2017. Effect of swine based probiotic on performance, diarrhoea scores, intestinal microbiota and gut health of grower-finisher crossbred pigs. *Livestock Science* 195 (2017) 74-79.
- Dowarah, R., Verma, A. K., Agarwal, N., Singh, P., Singh, B. R. 2018. Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets. *PLoS ONE* 13(3): e0192978.
- Duncan, S.H., Louis, P., Thomson, J.M., Flint, H.J. 2009. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*. 11, 2112–2122.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A. 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 308 (5728), 1635-1638

- Egeli AK, Framstad T, Morberg H. 1998. Clinical biochemistry, haematology and body weight in piglets. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 39:381-393.
- Ehrmann, M.A., Kurzak, P., Bauer, J., Vogel, R.F. 2002. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *Journal of applied microbiology* 92: 966-975.
- Errecalde, J. O. 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo, incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. FAO, Producción y Sanidad Animal. Roma. ISBN 92-5-305150-7.
- Ewing, W.N. 2008 *The living gut*. 2nd ed. Nottingham, UK: Nottingham University Press.
- FAO/OMS. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. 2001. Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico. 1-4 de octubre de 2001, Córdoba, Argentina, pp. 1-33.
- Fouhse, J. M., Zijlstra, R. T. and Willing, B. P. 2016. The role of gut microbiota in the health and disease of pigs. *Animal Frontiers* 6, 30-36.
- Friendship, R.M., Lumsden, J.H., McMillan, I., Wilson, M.R. 1984. Hematology and Biochemistry Reference Values for Ontario Swine. *Canadian journal of comparative medicine* 1984; 48: 390-393.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology*. 66, 365-378.
- Fusari, M. 2020. Empleo de probióticos en producción primaria de alimentos: impacto sobre el estado sanitario y la performance de crecimiento durante la crianza intensiva de cerdos. Tesis de Doctorado en Cs Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario.
- García del Moral, R. 1993. Laboratorio de Anatomía Patológica. Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana de España.
- Giang, H.H., Viet, T.Q., Ogle, B., Lindberg, J.E. 2010. Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a diet supplemented with potentially probiotic complexes of lactic acid bacteria. *Livestock Science* Volume 129, Issues 1-3, April 2010, Pages 95-103

- Hartemink, R., Domenech, V.R., Rombout, F.M. 1997. LAMVAB - A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods*. 29(2):77-84.
- Hedemann, M. S., Højsgaard S. and Jensen B. B. 2003. Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 87 (2003), 32–41. 2003 Blackwell Verlag, Berlin ISSN 0931–2439
- Herfel T. M., Jacobi S. K., Lin X., Jouni Z. E., Chichlowski M., Stahl C. H., and Odle J. 2013. Dietary supplementation of *Bifidobacterium longum* strain AH1206 increases its cecal abundance and elevates intestinal interleukin-10 expression in the neonatal piglet. *Food and Chemical Toxicology*. 60:116-22
- Hildebrand, F., Nguyen, T., Brinkman, B., Yunta, R.G., Cauwe, B., Vandenabeele, P., Liston, A., Raes, J. 2013. Inflammation associated enterotypes, host genotype, cage and inter-individual effects drive gut microbiota variation in common laboratory mice. *Genome Biology* 14:R4
- Janczyk1, 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 (2007) 132–140
- Jin, L., Marquardt, R., Baidoo, S. 2000. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:619-624.
- Kim H.B., Borewicz, K., White, B.A., Singer, R.S., Sreevatsan, S., Tu, Z.J., Isaacson, R.E. 2011. Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Veterinary Microbiology* 153 (2011) 124–133.
- Lan, R.X., Lee, S.I., Kim, I.H. 2016. Effects of multistrain probiotics on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, faecal microbial shedding, faecal score and noxious gas emission in weaning pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*.

- Le Dividich, J., Sève, B. 2000. Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments in the piglet. *Domestic Animal Endocrinology* 19 (2000) 63–74.
- Li M, Gong J, Cottrill M, Yu H, de Lange C, Burton J, Topp E. 2003. Evaluation of QIAamp® DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. *J. Microbiol. Methods*. 5
- Liao, S. F., Nyachoti, M. 2017. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Animal Nutrition* 3. 331-343.
- Ling, Z., Jin, C., Xie, T., Cheng, Y., Li, L., Wu, N. 2016. Alterations in the fecal microbiota of patients with HIV-1 infection: An observational study in a Chinese population. *Scientific report*, 6, 30673.
- Liong, M.T., Shah, N.P. 2005. Acid and bile tolerance and the cholesterol removal ability of bifidobacteria strains. *Bioscience and microflora*. 2005, 24, 1-10.
- Liu, H., Zhang, J., Zhang, S., Yang, F., Tracker, P.A., Zhang, G., Qiao, S., Ma. X. 2014. Oral administration of *Lactobacillus fermentum* I5007 favors intestinal development and alters the intestinal microbiota in formula-fed piglets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62, 860-866.
- Liu, X., Mao, B., Gu, J., Wu, J., Cui, S., Wang, G., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W. 2021. *Blautia*—a new functional genus with potential probiotic properties? *Gut Microbes*, 13:1, 1875796
- Loh, T. C., Choo, P. Y., Cheong, Y. H. 2002. Effects of organic acid and natural herbs on performance and incidence of diarrhoea in postweaning pigs. *Malaysian Journal of Animal Science* 7(2), 25-30.
- Lyberg, K., Lundh, T., Pedersen, C., Lindberg J.E. 2006., Influence of soaking, fermentation and phytase supplementation on nutrient digestibility in pigs offered a grower diet based on wheat and barley. *Animal Science*, Volume 82, Issue 6, pp. 853 – 858.
- Lye, H.S., Kuan, C.Y., Ewe, J.A., Fung, W.Y., Liong, M.T., 2009. The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, renin and phytoestrogens. *International journal of molecular sciences* 2009, 10, 3755-3775.

- Mach, N., Berri, M., Estelle, J., Levenez, F., Lemonnier, G., Denis, C., et al. 2015. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environmental microbiology reports* 7, 554–569.
- Madec, F., Bridoux, N., Bounaix, S., Jestin, A. 1998. Measurement of digestive disorders in the piglets at weaning and related risks factors. *Preventive veterinary medicine* 35:53-72
- Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., Mc Kaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., Doyle, J., Jewell, L., De Simone, C. 2001. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *American Gastroenterological Association. Gastroenterology* 2001, 121(3):580–591.
- MAGyP. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Anuario Porcino 2020. Disponible en: https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/porcinos/estadistica/_archivos//000005-Anuario/200000_Anuario%202020.pdf
- Maldonado Saavedra, O., Ramírez Sánchez, I., García Sánchez, J.R., Ceballos Reyes, G.M., Méndez Bolaina, E. 2012. Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas* vol. 43 n°2.
- Maribo, H., B. B. Jensen, and M. S. Hedemann. 2000. Different doses of organic acids to piglets. *Danish Bacon and Meat Council*, no. 469. Copenhagen, Denmark.
- Maron, D. F., Smith, T. J. S., Nachman, K. E. 2013. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Globalization and Health* 2013, 9:48.
- Messaoudi, S., Kergourlay, G., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Ferchichi, M., Prévost, H., Pilet, M.F., Chobert, J.M., Manai, M., Dousset, X. 2012. Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food Microbiology*.
- Messaoudi, S., Manaic, M., Kergourlaya, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J.M., Dousset, X. 2013. Review *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology* 36: 296-304.
- Min, Y., Choi, Y., Choe, J., Kim, Y., Jeong, Y., Kim, D., Kim, J., Jung, H., Song, M. 2019. Effects of dietary mixture of protease and probiotics on growth performance, blood constituents, and carcass characteristics of growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science and Technology* 61(5):272–277.

- Moturi, J., Kim, K.Y., Hosseindoust, A., Lee, J.H., Xuan, B., Park, J., Kim, E.B., Kim, J.S., and Chae, B.J. 2021. Effects of *Lactobacillus salivarius* isolated from feces of fast-growing pigs on intestinal microbiota and morphology of suckling piglets. Nature portfolio, Scientific Reports, 11:6757.
- Nabuurs, M. J. A., Hoogendoorn, A., Van der Molen, E. J., Van Osta, A. L. 1993. M. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. Research in Veterinary Science 1993, 55, 78-84.
- NRC (National Research Council). 2012. Nutrient Requirements of Swine. Nonnutritive Feed Additives. Washington DC: National Academy Press.
- OECD/FAO (2022), OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2022-2031, OECD Publishing, Paris.
- Osio, O. 1992. El metabolismo del colesterol. Acta Médica Colombiana Vol 17 N° 3
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., Brown, P. O., 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. PLoS biology 5, e177.
- Patience, J.F. 2012. Feed efficiency in swine. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Perri AM, O'Sullivan TL, Harding JCS, Wood RD, Friendship RM. 2017. Hematology and biochemistry reference intervals for Ontario commercial nursing pigs close to the time of weaning. The Canadian Veterinary Journal 58:371–6.
- Pieper, R., Janczyk, P., Urubshurov, V., Korn, U., Pieper, B., Souffrant W.B. 2009. Effect of a single oral administration of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 8862/8866 before and at the time point of weaning on intestinal microbial communities in piglets. International Journal of Food Microbiology 130 (2009) 227–232.
- Pieper, R., Janczyk, P., Zeyner, A., Smidt, H., Guiard, V., Souffrant, W.B. 2008. Ecophysiology of the Developing Total Bacterial and *Lactobacillus* Communities in the Terminal Small Intestine of Weaning Piglets. Microbial ecology 56:474–483
- Pigeon, R.M., Cuesta, E.P., Gilliland, S.E. 2002 Binding of free bile acids by cells of yogurt starter culture bacteria. Journal of Dairy Science 85, 2705-2710
- Pluske J. R., Williams I. H. and Aherne F. X. 1996. Maintenance of villous height and crypt depth in piglets by providing continuous nutrition after weaning. British Society of Animal Science 1996, 62: 131-144

- Pluske, J. R., Turpin, D. L., Kim, J. C. 2017. Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig, *Animal Nutrition* 187-196.
- Pluske, J.R., Williams, I.H., Aherne, F.X., 1995. Nutrition of the neonatal pig. In: *The Neonatal Pig Development and Survival*. (Ed. Varley MA), CAB International, Wallingford, UK, pp. 187–235.
- Rastall, R.A. 2004. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. *The Journal of nutrition* 134(8 Suppl.), 2022S–2026S.
- Resolución 22/2019. Acceso 22/07/19, disponible en: https://www.cac.com.ar/data/documentos/42_Res.%20SENASA%2022%2019.pdf
- Rogosa, M., Wiseman, R.F., Mitchell, J.A., Disraely, M.N., Beaman, A.J. 1953. Species differentiation of oral lactobacilli from man including descriptions of *Lactobacillus salivarius* nov spec and *Lactobacillus cellobiosus* nov spec. *Journal of Bacteriology* 1953;65:681–699.
- Ruiz, J., Olivero, C., Etcheverria, A., Sequeira, G., Rosmini, M., Zbrun V., Signorini, M. 2020. Efecto protector de *Lactobacillus plantarum* LP5 en un modelo murino de colonización con *Campylobacter Coli* DSPV 458. Asociación Argentina de Microbiología Jornadas Inocuidad en Producción Porcina: enfoque desde el concepto de Una Salud. M.3.4. 40:41. ISBN 978-987-46701-7-5
- Sayan, H., Assavacheep, P., Angkanaporn, K., Assavancheep, A. 2018. Effect of *Lactobacillus salivarius* on growth performance, diarrhea incidence, fecal bacterial population and intestinal morphology of suckling pigs challenged with F4⁺ enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Asian- Australian Journal of Animal Sciences*. Vol 31, No. 8:1308-1314.
- Schalm's Veterinary. 2010. Thorn C.E. Hematology of the pig. In: Weiss DJ, Wardrop KJ, eds. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th ed. Ames, Iowa: Wiley Blackwell; 2010:843– 851.
- Shen, Y., Carroll, J., Yoon, I., Mateo, R., Kim, S., 2011. Effects of supplementing fermentation product in sow diets on performance of sows and nursing piglets. *Journal of Animal Science* 89, 2462–2471.

- Shonyela, S.M., Feng, B., Yang, W., Yang, G. and Wang, C. 2020. The regulatory effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on T lymphocyte and the development of intestinal villi in piglets of different periods. *AMB Express* (2020) 10:76.
- Shurson, G.C. 2017. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. *Animal Feed Science and Technology* 235 (2018) 60–76.
- Simpson JM, McCracken VJ, Gaskins HR, Mackie RI. 2000. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4705–4714.
- Singh, K., Kallali, B., Kumar, A., Thaker, V. 2011. Probiotics: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 287–290.
- Smith, A.L., Stalder, K.J., Serenius, T.V., Baas, T.I., Mabry, J.W. 2008. Effect of weaning age on nursery pig and sow reproductive performance. *Effect of weaning age on nursery pig and sow reproductive performance*, 131-137.
- Starzyński, R.R., Laarakkers, C.M.M., Tjalsma, H., Swinkels, D.W., Pieszka, M., Stys, A. 2013. Iron supplementation in suckling piglets: how to correct iron deficiency anemia without affecting plasma hepcidin levels. *PLoS ONE* 8:e64022.
- Stoppani, C., Suarez del Cerro, M., Beribe, M.J., Zimmermann, J.A., Frizzo, L.S., Soto, L.P. 2020. Administración de *Lactobacillus salivarius* DSPV014C y modulación de la microbiota intestinal en cerdos de recría. *Asociación Argentina de Microbiología Jornadas Inocuidad en Producción Porcina: enfoque desde el concepto de Una Salud*. M.3.5: 41:42. ISBN 978-987-46701-7-5.
- Suo, C., Yin, Y., Wang, X., Lou, X., Song, D., Wang, X., Gu, Q. 2012. Effects of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 on pig growth and meat quality. *BMC Veterinary Research* 2012, 8:89.
- Svartstrom, O., Karlsson, F., Fellstrom, C., Pringle, M., 2013. Characterization of *Treponema* spp. Isolates from pigs with ear necrosis and shoulder ulcers. *Veterinary Microbiology* 166 (3-4), 617-623.
- Swedres-Svarm. 2018. Consumption of antibiotics and occurrence of resistance in Sweden. Solna/Uppsala ISSN1650-6332

- Tang, K. L., Caffrey, N. P., Nóbrega, D. B., Cork, S. C., Ronksley, P.E., Barkema, H. W., Polachek, A. J. Ganshorn, H., Sharma, N., Kellner, J. D., Ghali, W. A. 2017. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Plan Health*; 1: e316–27.
- Thu, T.V., Loh, T.C., Foo, H.L., Yaakub, H., Bejo M.H. 2011. Effect of liquid metabolite combination produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance, faeces characteristic, intestinal morphology and diarrhoea incidence in postweaning piglets. *Tropical Animal Health and Production* (2011) 43:69-75
- Upadhaya, S.D., Shanmugam, S.K., Kang, D.K., Kim, I.H. 2017 Preliminary assessment on potentials of probiotic *B. subtilis* RX7 and *B. methylotrophicus* C14 strains as an immune modulator in *Salmonella*-challenged weaned pigs. *Tropical Animal Health and Production* (2017) 49:1065–1070
- USDA-GAIN 2021. Livestock and Products Semi-annual. European Union. Report number: E4201-0026
- Veizaj-Delia, E., Pirushi, R. 2012. The utilization of probiotics as a way to improve human and animal gut health. *Macedonian Journal of Animal Science*, 2012;2:175e81.
- Ventrella, D., Dondi, F., Barone, F., Serafini, F., Elmi, A., Giunti, M., Romagnoli, N., Forni, M., Bacci, M.L. 2017. The biomedical piglet: Establishing reference intervals for haematology and clinical chemistry parameters of two age groups with and without iron supplementation. *BMC veterinary research* 13 1–8.
- Vieco-Saiz N, Belguesmia Y, Raspoet R, Auclair E, Gancel F, Kempf I and Drider D. 2019 Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in microbiology* 10:57.
- Wahlström, A., Sayin, S.I., Marschall, H.U., and Bäckhed, F. 2016. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. *Cell metabolism* 24, 41–50.
- Walsh, M. C., Gardiner, G. E., Hart, O. M., Lawlor, P. G., Daly, M., Lynch, B., Richert, B. T., Radcliffe, S., Giblin, L., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, P. 2008. Pre-dominance of a bacteriocin-producing *Lactobacillus salivarius* component of a five-

- strain probiotic in the porcine ileum and effects on host immune phenotype. *FEMS Microbiology Ecology* 64, 317-327.
- Wang, A. N., Yi, X. W., Yu, H. F., Dong, B., Qiao, S. Y. 2009. Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum* in vitro and its anti-oxidative effect on growing-finishing pigs. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1140–1148.
- Wang, T., Teng, K., Liu, Y., Shi, W., Zhang, J., Zhang, X., Dong, E., Tao, Y., Zhong, J. 2019. *Lactobacillus plantarum* PFM 105 promotes intestinal development through modulation of gut microbiota in weaning piglets. *Frontiers in microbiology* 10:90.
- Wenk, C., Pfirter, H.P. and Bickel, H., 1980. Energetic aspects of feed conversion in growing pigs. *Livestock Production Science*, 7: 483--495.
- Whitton, C., Bogueva, D., Marinova, D., Phillips, C.J.C. 2021 Are We Approaching Peak Meat Consumption? Analysis of Meat Consumption from 2000 to 2019 in 35 Countries and Its Relationship to Gross Domestic Product. *Animals* 2021, 11, 3466.
- Willing, B. P., Malik, G., van Kessel, A. G. 2012. Nutrition and gut health in swine. In: Chiba LI, editor. *Sustainable swine nutrition*. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 2012. p. 197-213.
- Wilson, G.D.A., Harvey, D.G., Snook, C.R. 1972. A review of factors affecting blood biochemistry in the pig. *British Veterinary Journal* (1972), u8,596.
- Yadav, R., Puniya, A. K., Shukla, P. 2016. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an indigenous fermented beverage Raabadi. *Frontiers in Microbiology*; 7, 1683–1691.
- Yang, J., Wang, C., Huang, K., Zhang, M., Wang, J., Pan, X. 2020. Compound *Lactobacillus* sp. administration ameliorates stress and body growth through gut microbiota optimization on weaning piglets. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2020) 104:6749–6765
- Yu, H.F., Wang, A.N., Li, X.J., Qiao, S.Y. 2008. Effect of viable *Lactobacillus fermentum* on the growth performance, nutrient digestibility and immunity of weaned pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 17, 2008, 61–69
- Zhang, J., Deng, J., Wang, Z., Che, C., Li, Y. F., Yang, Q., 2011. Modulatory effects of *Lactobacillus salivarius* on intestinal mucosal immunity of piglets. *Current Microbiology* 62, 1623-1631.

- Zhang, L., Wu, W., Lee, Y.K., Xie, J. Zhang, H. 2018. Spatial Heterogeneity and Co-occurrence of Mucosal and Luminal Microbiome across Swine Intestinal Tract. *Frontier of Microbiology*. 9:48.
- Zhang, X, Y.Q., Liu, H.Y., Lai, T., Ma, J.L., Wang, J.F., Zhu, Y.H. 2010. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG using an *Escherichia coli* K88 model of piglet diarrhoea: Effects on diarrhoea incidence, faecal microflora and immune responses. *Veterinary Microbiology* Volume 141, Issues 1–2, 24 February 2010, Pages 142-148
- Zhang, Z.F., Lee, J.M., Kim, I.H. 2014. Effects of *Enterococcus faecium* DSM 7134 on weanling pigs were influenced by dietary energy and crude protein density. *Livestock Science* 169(2014)106–111
- Zhao, P.Y., Kim, I.H., 2015. Effects on direct-fed microbial on growth performance, nutrient digestibility, fecal noxious gas emission, fecal microbial flora and diarrhea score in weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology* 200 (2015) 86-92.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O’Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2020;70:2782–2858.
- Zhou, L., Fang, L., Sun, Y., Su, Y., Zhu, W. 2015. Effects of the dietary protein level on the microbial composition and metabolomic profile in the hindgut of the pig. *Anaerobe* 38 (2016) 61-69
- Zimmermann, J.A. 2020. Aplicación de diferentes matrices transportadoras de probióticos destinadas a cerdos en producción primaria. Tesis de Doctorado en Cs Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral
- Zimmermann, J.A., Fusari, M.L., Rossler, E., Blajman, J.E., Romero-Scharpen, A., Astesana, D.M., Olivero, C.R., Berisvil, A.P., Signorini, M.L., Zbrun, M.V., Frizzo, L.S., Soto, L.P. 2016. Effects of probiotics in swines growth performance: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Animal Feed Science and Technology* Volume 219, September 2016, Pages 280-293.