

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
Instituto de Ciencias Agrícolas



**EVALUACIÓN DE *Bacillus subtilis* DE INTESTINO  
DELGADO DE CERDOS PARA CONTRARRESTAR  
LOS EFECTOS DEL ESTRÉS POR CALOR**

**T E S I S**

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN  
ANIMAL**

P R E S E N T A:

**ANDRÉS FELIPE SUÁREZ RUBIANO**

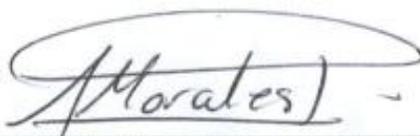
DIRECTORA DE TESIS

**DRA. ADRIANA MORALES TREJO**

La presente tesis titulada “**EVALUACIÓN DE *Bacillus subtilis* DE INTESTINO DELGADO DE CERDOS PARA CONTRARRESTAR LOS EFECTOS DEL ESTRÉS POR CALOR**”, realizada por C. Andrés Felipe Suárez; bajo la dirección de la Dra. Adriana Morales Trejo, siendo aceptada, revisada y aprobada, por el Comité Particular abajo indicado como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL**

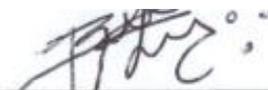
**Comité particular**



Dra. Adriana Morales Trejo  
**Director de Tesis**

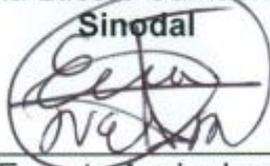


Dr. Miguel Cervantes Ramirez  
**Secretario**



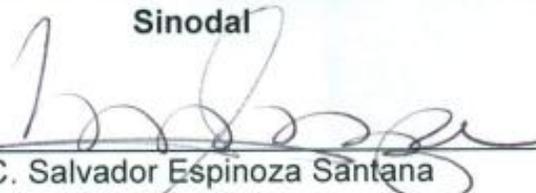
Dra. Reyna Lucero Camacho Morales

**Sinodal**



Dr. Ernesto Avelar Lozano

**Sinodal**



M.C. Salvador Espinoza Santana

**Sinodal**

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

## DEDICATORIA

*Dedico esta tesis a mis padres Beatriz Rubiano y Héctor Suárez, que siempre me han apoyado incondicionalmente en mi formación personal y profesional para poder llegar a ser la persona de hoy en día. Gracias por apoyarme todos los días con sus llamadas y mensajes, darme el ánimo y fuerza para poder continuar siempre con mi aventura y darme el mejor ejemplo de responsabilidad con la vida misma.*

*A mis hermanos Viviana y Sebastián Suárez por escucharme y estar siempre disponibles para ayudarme aún en la distancia, también sus mensajes y llamadas fueron de gran importancia en todo momento.*

*A mis amigos y el resto de mi familia quienes en algún momento estuvieron pendientes de mí y quisieron de corazón desearme siempre lo mejor.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California e Instituto de Ciencias agrícolas por permitirme realizar el posgrado en su institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico durante mis estudios.

A mi directora de tesis; la Dra. Adriana Morales Trejo, por sus consejos, por el gran apoyo brindado durante todo este proceso, además por sus aportaciones y sugerencias en el desarrollo de mi tesis, muchas gracias.

Al Doctor Miguel Cervantes, por el aporte de su gran conocimiento y ejemplo de pedagogía y pasión por la investigación, siempre me sorprendió con todo lo que sabía en cualquier área.

Al Dr. Ernesto Avelar Lozano, por sus consejos, comentarios de tesis, pero sobretodo por su manera de ser, sin duda alguna siempre me hizo reír con sus historias.

Agradezco de manera especial a la MC Nydia Vásquez por su colaboración en las histologías de esta tesis.

A todos mis compañeros, profesores y demás personas que hicieron parte de esta experiencia de vida, muchas gracias por su apoyo.

## I. RESUMEN

Durante el verano en el norte de México se alcanzan temperaturas superiores a 45°C, en esta condición los animales presentan estrés por calor (EC), caracterizado por baja producción, cambios en la fisiología e incluso daño al epitelio intestinal. El uso de probióticos podría mejorar la salud intestinal de los cerdos en EC. Se realizaron dos experimentos para evaluar el efecto de la suplementación con *Bacillus subtilis*. Experimento 1, se emplearon ocho cerdos canulados en íleon suplementados con  $2.16 \times 10^8$  UFC de *B. subtilis* en la temperatura intestinal y microbiota de intestino delgado a los 0, 2 y 8 días de exposición a EC respectivamente. La temperatura ambiental en EC fue  $35.0 \pm 5$  °C. La temperatura intestinal de los cerdos en EC se incrementó 0.78 °C ( $P < 0.001$ ). La suplementación con *B. subtilis* no tuvo efecto en la temperatura intestinal de los cerdos en EC ( $P = 0.211$ ). Los cerdos suplementados con *B. subtilis* incrementaron su población de *E. coli* ( $P \leq 0.05$ ), pero no se afectó la población de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Clostridium* ( $P > 0.10$ ). En conclusión la suplementación con *B. subtilis* no modificó la temperatura intestinal de los cerdos en EC, y a excepción de *E. coli*, tampoco afectó a la microbiota intestinal. Experimento 2, se evaluó el efecto de suplementar con  $8.16 \times 10^{10}$  UFC de *B. subtilis* en la producción, microbiota e integridad del epitelio intestinal de cerdos en EC. Se emplearon 14 cerdos (20 kg PV), divididos en dos tratamientos: 1) Testigo, dieta a base de trigo-pasta de soya; 2) EC, suplementados con *B. subtilis*. La suplementación no mejoró los parámetros productivos ( $P > 0.10$ ). Los cerdos suplementados mostraron una tendencia a reducir la población de *E. coli*, ( $P = 0.093$ ), e incrementaron su población de *Bifidobacterium* ( $P = 0.068$ ). La altura de las vellosidades de duodeno e íleon se incrementó ( $P \leq 0.002$ ) en los cerdos suplementados con *B. subtilis*. Aunque *B. subtilis* no mejoró los parámetros productivos de los cerdos en EC, sí ayudó a controlar el crecimiento de bacterias nocivas (*E. coli*), y favoreció el crecimiento de bacterias benéficas (*Bifidobacterium*); además, mejoró las condiciones de las vellosidades intestinales.

*Palabras clave: estrés calórico, probióticos, Bacillus subtilis.*

---

## CONTENIDO

I. RESUMEN.....	2
II. ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	5
III. INTRODUCCIÓN.....	7
IV. MARCO TEÓRICO.....	11
4.1 Escenario de cambio climático de México.....	11
4.2 Estrés.....	12
4.2.1 Estrés por calor.....	13
4.2.2 Efectos del estrés por calor en producción animal.....	13
4.2.3 Efecto del estrés por calor en el epitelio intestinal.....	15
4.2.4 Efecto del estrés por calor en la microbiota intestinal.....	15
4.3 Probióticos: Concepto.....	16
4.3.1 Microorganismos probióticos comúnmente usados.....	17
4.3.2 Modo de acción.....	17
4.3.3 Uso y función de probióticos en cerdos.....	18
4.3.4 Uso de <i>Bacillus subtilis</i> como probiótico en cerdos y otras especies.....	19
4.3.5 Características microbiológicas del <i>Bacillus subtilis</i> .....	20
V. HIPÓTESIS.....	23
VI. OBJETIVO.....	24
6.1 Objetivos específicos.....	24
<b>VII. EXPERIMENTO 1.</b> Efecto de la suplementación con <i>B. subtilis</i> en la temperatura intestinal y composición de la microbiota de intestino delgado de cerdos en crecimiento en condiciones de estrés por calor.....	25

---

7.1 Objetivo.....	25
7.2 Materiales y métodos.....	25
7.2.1 Preparación del suplemento de <i>B. subtilis</i> .....	27
7.2.2 Toma de muestras de contenido ileal.....	28
7.2.3 Extracción de ADN de muestras de contenido ileal.....	29
7.2.4 Determinación de las variaciones en la microbiota intestinal.....	29
7.2.5 Determinación de la presencia de genes de antibióticos en <i>B. subtilis</i> .....	31
7.2.6 Análisis estadístico.....	31
7.3 Resultados y discusión.....	33
<b>VIII. EXPERIMENTO 2.</b> Efecto de la suplementación con <i>B. subtilis</i> en el comportamiento productivo, composición de la microbiota y estructura del epitelio intestinal de cerdos en estrés por calor.....	44
8.1 Objetivo.....	44
8.2 Materiales y métodos.....	44
8.2.1 Colecta de muestras de contenido ileal.....	45
8.2.2 Colecta de muestras para análisis histológico de epitelio intestinal.....	45
8.2.3 Análisis estadístico.....	46
8.3 Resultados y discusión.....	46
<b>IX. CONCLUSIÓN</b> .....	56
<b>X. LITERATURA CITADA</b> .....	57
<b>XI. ANEXOS</b> .....	73

## II. ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

<b>Cuadro 1.</b> Composición de la dieta experimental.....	27
<b>Cuadro 2.</b> Secuencias de oligonucleótidos empleados para el análisis de composición microbiológica de contenido intestinal de cerdos en crecimiento en condiciones de estrés por calor.....	30
<b>Cuadro 3.</b> Condiciones de amplificación para las muestras de qPCR.....	31
<b>Cuadro 4.</b> Secuencias de oligonucleótidos empleados para el análisis de la presencia de genes de antibióticos en cepa de <i>B. subtilis</i> .....	32
<b>Cuadro 5.</b> Condiciones de amplificación para las muestras de PCR.....	32
<b>Cuadro 6.</b> Temperatura intestinal de los cerdos durante el período de confort, o en el período que fueron alimentados con la dieta testigo o suplementados con <i>B. subtilis</i> en estrés por calor.....	36
<b>Cuadro 7.</b> Promedio del Ct de amplificación de ADN de microorganismos intestinales analizados en cerdos alimentados con la dieta testigo o con la suplementación de <i>B. subtilis</i> en los días 0, 2 y 8 de exposición al estrés por calor.....	39
<b>Cuadro 8.</b> Promedio del Ct de amplificación de ADN de microorganismos intestinales analizados en cerdos al día cero (confort) y en los días 2 y 8 de exposición al estrés por calor.....	40
<b>Cuadro 9.</b> Promedio del Ct de amplificación de ADN de microorganismos intestinales analizados en cerdos alimentados con la dieta testigo o con la suplementación de <i>B. subtilis</i> .....	40
<b>Cuadro 10.</b> Parámetros productivos de los cerdos en estrés por calor alimentados con una dieta testigo o suplementada con <i>B. subtilis</i> (GDP, ganancia diaria de peso; CDA, consumo diario de alimento; CA, conversión alimenticia).....	49
<b>Cuadro 11.</b> Promedio del Ct de amplificación de ADN de microorganismos intestinales relativo a producto amplificado de bacterias totales (RNA ribosomal 16S) analizados en cerdos alimentados con la dieta testigo o con la suplementación de <i>B. subtilis</i> en condiciones de estrés por calor.....	52

---

<b>Cuadro 12.</b> Parámetros histológicos de vellosidades intestinales (micras), en las diferentes secciones y en promedio de intestino delgado de cerdos en EC alimentados con una dieta testigo o suplementados con <i>B. subtilis</i> .....	54
<b>Figura 1.</b> Cambios en el promedio de la temperatura anual para el futuro (2015-2039).....	12
<b>Figura 2.</b> Promedio de la temperatura ambiental a lo largo del día durante los períodos de confort o estrés por calor.....	33
<b>Figura 3.</b> Promedio de la Humedad relativa a lo largo del día durante los períodos de confort o estrés por calor.....	34
<b>Figura 4.</b> Variación promedio a lo largo del día en el índice de calor durante los períodos de confort o estrés por calor.....	34
<b>Figura 5.</b> Temperatura intestinal de los cerdos durante el período de confort, o en el período que fueron alimentados con la dieta testigo o suplementados con <i>B. subtilis</i> .....	35
<b>Figura 6.</b> Variaciones en la abundancia relativa al día 0 de microorganismos intestinales analizados en cerdos alimentados con la dieta testigo o con la suplementación de <i>B. subtilis</i> en los días 2 y 8 de exposición al estrés por calor..	37
<b>Figura 7.</b> Fragmentos de ADN, amplificados por PCR punto final.....	41
<b>Figura 8.</b> Variación promedio de la temperatura ambiental a lo largo del día durante el período de estrés por calor.....	47
<b>Figura 9.</b> Variación promedio de la Humedad relativa a lo largo del día durante el período de estrés por calor.....	48
<b>Figura 10.</b> Variación promedio a lo largo del día en el índice de calor durante el período experimental.....	48
<b>Figura 11.</b> Variaciones relativas en la microbiota intestinal de cerdos en EC alimentados con la dieta testigo o con suplementación de <i>B. subtilis</i> .....	51

### III. INTRODUCCIÓN

En el norte de México se concentra la mayor producción intensiva de cerdos, ganado de carne y varias de las cuencas lecheras más importantes del país. Lamentablemente la producción animal en esta región decae hasta un 40% durante los meses de verano cuando se registran temperaturas que superan los 40°C según el Servicio Meteorológico Nacional (<http://smn.cna.gob.mx/>, 2017) y Anzures *et al.*, (2015). Esta temperatura es más alta a la temperatura de confort de los animales, quienes en consecuencia padecen estrés por calor.

El estrés por calor se define como la serie de alteraciones fisiológicas, metabólicas, inmunológicas y de conducta que sufren los animales cuando se exponen a temperatura y humedad relativa elevadas (Horowitz *et al.*, 2004), que afectan su salud y producción en diferente medida, dependiendo de la intensidad del mismo. Incrementos en la frecuencia cardíaca y la tasa respiratoria (Christison y Johnson, 1972; Collier *et al.*, 1982; Hanh *et al.*, 1999), además de, reducción marcada en el consumo de alimento (Aberle *et al.*, 1974; Huynh *et al.*, 2005) son los principales efectos fisiológicos y de conducta del estrés por calor. La mayoría de esos estudios se realizaron con animales bajo condiciones en las que la temperatura máxima no rebasó los 35° C, la que es considerablemente inferior a la registrada cada verano en el norte de México. Por ejemplo, en condiciones experimentales de producción durante el verano en el valle de Mexicali, los cerdos incrementaron hasta dos veces la frecuencia cardíaca y respiratoria, en comparación con cerdos alojados en condiciones de confort, además de un incremento de hasta 1.2° C en la temperatura corporal (Cota *et al.*, 2013).

La reducción en el consumo de alimento está íntimamente ligada con las pérdidas económicas asociadas al estrés por calor. Huynh *et al.* (2005) indican que el consumo en cerdos de 60 kg de peso, disminuye linealmente a partir de que la temperatura ambiental alcanza los 23°C. Le Dividich *et al.* (1998) observaron una disminución en el consumo voluntario de alimento de 40 a 80 g/d

---

por cada grado centígrado de incremento en la temperatura ambiental. Quiniou *et al.* (2000) desarrollaron una ecuación con la cual se calcula que cerdos de 45 y 75 kg peso reducen su consumo voluntario en 48 y 77 g/d, respectivamente, por cada grado de incremento en la temperatura ambiental, de 19 a 29°C. Según esta ecuación, el consumo voluntario de alimento que tendrían cerdos de 60 kg de peso en el valle de Mexicali a 40 y 45°C sería de 776 y 560 g/d, respectivamente. Sin embargo, en un estudio realizado en la unidad experimental del ICA- UABC Mexicali durante el verano, con temperaturas de hasta 45°C, se observó un consumo superior al kilogramo de alimento por animal al día (Morales *et al.*, 2014). La diferencia entre el valor estimado con la ecuación de Quiniou *et al.* (2000) y el observado indica que el animal realiza modificaciones en su fisiología durante la etapa de aclimatación, lo cual se refleja en un consumo superior al estimado. Además, Le Bellego *et al.* (2012) observaron que la reducción en el consumo de alimento debido al estrés por calor se asocia al calor generado por la digestión y el metabolismo de los nutrientes de los alimentos.

La digestión de los alimentos y el metabolismo de los nutrientes generan calor (incremento calórico) debido a que la totalidad de las reacciones involucradas en estos procesos son de naturaleza exotérmica (Baumgard y Rhoads, 2013). Cuando los animales se alojan bajo condiciones de termo-neutralidad, el incremento calórico se emplea para mantener la temperatura corporal. Es probable que cuando la temperatura ambiental supera a la corporal, el animal trata de disipar el calor y reducir los efectos negativos del estrés modificando la expresión de las proteínas involucradas en el metabolismo de energía, síntesis de grasa y síntesis proteica.

La exposición de cerdos a ambientes con temperatura elevada afecta su capacidad para regular su temperatura corporal. Estudios recientes muestran que la temperatura corporal se incrementa hasta 2 °C, en comparación con animales alojados en condiciones de termo-neutralidad (Morales *et al.*, 2013); y aún más, la temperatura intestinal se eleva alrededor de 1.5 °C durante la exposición de los

---

cerdos a temperatura ambiental elevada (Arce *et al.*, 2013); en consecuencia la fisiología intestinal de los cerdos podría verse afectada. De hecho, algunos autores (Yu *et al.*, 2010; Pearce *et al.*, 2013) reportan daños en el epitelio intestinal de cerdos expuestos de forma aguda (primeros dos días) a temperatura ambiental elevada, sugiriendo afectaciones en la capacidad de absorción de nutrientes así como predisposición a infecciones y diarreas. Se desconoce el efecto que el calor pueda provocar en la microbiología intestinal así como en su integridad y funcionamiento.

De acuerdo con la FAO, los probióticos se definen como "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud (FAO / OMS, 2001). Estos productos también pueden mejorar la salud intestinal de los cerdos (Kenny *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2011). Los probióticos incluyen una gran variedad de microorganismos de diferentes géneros como *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, entre otros, y entre los beneficios que ofrecen está el control del crecimiento de bacterias nocivas en intestino a través de la producción de metabolitos como enzimas y antibióticos; además, algunos probióticos ayudan a mejorar la digestión del alimento y producen otros compuestos como vitaminas del complejo B que favorecen la utilización de nutrientes (Resta, 2009). El uso de probióticos se ha extendido a la producción de alimentos de origen animal, particularmente en cerdos se han empleado microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* y varias especies de *Bacillus* (Kumar *et al.*, 2012). El creciente interés en los probióticos se debe esencialmente al problema de la resistencia microbiana a los antibióticos y tras su prohibición en la producción animal, los probióticos se consideran un medio alternativo para reducir la infección por patógenos y mejorar la salud animal especialmente al momento del destete (Butaye *et al.*, 2003). Sin embargo, todavía hay una necesidad de aclarar la eficacia probiótica en los cerdos, y los mecanismos subyacentes mediante el cual actúan.

En general, se ha sugerido el uso de probióticos en animales en condiciones susceptibles a enfermedades, en recién nacidos, al momento del

destete o en animales en recuperación después de problemas digestivos (Link y Kovac; 2006), tomando en cuenta los reportes de daño al epitelio intestinal de los cerdos en condiciones de estrés por calor, la administración de algún probiótico podría tener un efecto positivo en su salud intestinal.

Actualmente son numerosos los estudios asociados al suministro de probióticos que se han realizado a nivel mundial en cerdos (Dowarah *et al.*, 2017), sin embargo, son diversos los resultados en cuanto a la respuesta generada a los parámetros productivos, por lo que se considera fundamental generar nuevos estudios que complementen y respalden esta información para tener mayor confiabilidad en el uso de estos productos.

En años recientes debido al calentamiento global, se están llevando a cabo una gran variedad de estudios acerca del impacto del estrés por calor en los animales, no solamente a nivel de producción, sino también para conocer su efecto a nivel fisiológico con el afán de establecer nuevas medidas de manejo de los animales para aminorar el problema.

---

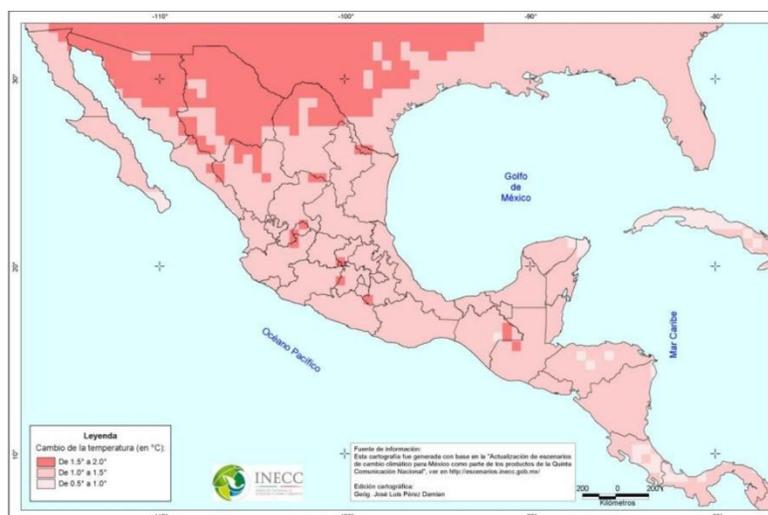
## IV. MARCO TEÓRICO

### 4.1. Escenario de cambio climático de México

El sector productivo de México es eje de la economía y bienestar social. De acuerdo con el decreto en que se aprueba el Programa Especial de Cambio Climático 2014-2018, se deben generar estrategias que reduzcan la vulnerabilidad y garanticen su productividad y competitividad del sector productivo. Se ha evaluado la vulnerabilidad de diversos sectores bajo escenarios de cambio climático durante las dos últimas décadas en México. Estos estudios coinciden en proyectar, que para el año 2100 (promedio 2075 a 2099), habrá un incremento de más de 4°C en la temperatura ambiental de la zona fronteriza con Estados Unidos, y de alrededor de 2.5 y 3.5°C en el resto del país. Por lo anterior, el Impacto del cambio climático en el sector agropecuario de la región sería muy importante y podría provocar severas pérdidas en la productividad del sector (Diario Oficial de la Federación, 2014).

Como puede apreciarse en la Figura 1, en los próximos años el norte del país podría presentar un aumento de 2°C de temperatura, mientras que en la mayoría del territorio los cambios se proyectan en un rango de 1°C a 1.5°C, con excepción de ciertas áreas en las zonas peninsulares, en las que los cambios serían menores, llegando a un aumento máximo de 1°C (Diario Oficial de la Federación, 2014).

Ante estos eventos, el sector pecuario debe desarrollar estrategias que permitan la mitigación y adaptación a esos cambios. Estudios realizados con animales bajo condiciones de estrés por calor, permitirían un mejor entendimiento a los efectos que pueda generar este cambio en la producción animal.



**Figura 1.** Cambios en el promedio de la temperatura anual para el futuro (2015-2039) (Diario Oficial de la Federación, 2014).

## 4.2 Estrés

Según Dobson y Smith (2000), el estrés ocurre por la incapacidad de un animal para hacer frente a su medio, fenómeno que a menudo se refleja en una falla para lograr el potencial genético. El estrés representa la reacción del organismo frente a estímulos que alteran el equilibrio fisiológico normal o la homeostasis, a menudo con efectos perjudiciales (David *et al.*, 1990), siendo este a su vez un fenómeno complejo que altera las respuestas fisiológicas, psicológicas y de comportamiento de un animal (Sharma *et al.*, 1999). Por otra parte, Ramendra *et al.* (2016), lo definen como una reacción de reflejo de los animales en ambientes hostiles y que causa consecuencias desfavorables que van desde el malestar hasta la muerte.

Los estresores pueden ser ambientales (calor y frío extremos), nutricionales (privación de alimento/agua), sociales y psicológicos (miedo/restricción), internos (enfermedad/patógenos/toxinas) y fisiológicos (gestación/lactancia). La reacción de un animal a factores estresantes depende de la duración y la intensidad de los estresores, la experiencia previa del animal con los factores estresantes, su estado fisiológico y las restricciones ambientales inmediatas (Ganaie, 2012).

#### **4.2.1 Estrés por calor**

La temperatura es uno de los factores de estrés más desafiantes, que afecta la salud humana y animal. Aunque los seres humanos tienen la capacidad de soportar grandes variaciones en la temperatura ambiental, un aumento relativamente pequeño de la temperatura interna puede provocar lesiones e incluso la muerte (Crandall y González 2010). Cuando la temperatura ambiente y otras condiciones ambientales crean una situación que está por debajo o por encima de los valores umbral respectivos, la eficiencia se ve comprometida porque los nutrientes son desviados para mantener la eutermia (temperatura fisiológica) ya que preservar una temperatura corporal segura se convierte en la más alta prioridad sobre la síntesis del producto (leche o carne; Baumgard y Rhoads, 2013).

Los medios primarios no evaporativos de enfriamiento (conducción, convección y radiación) se vuelven menos eficaces conforme se incrementa la temperatura ambiental, entonces el animal se vuelve cada vez más dependiente del sudor y el jadeo para aliviar el estrés por calor (Kimothi y Ghosh, 2005). Se han observado una serie importante de respuestas fisiológicas cuando los animales se exponen a temperatura y humedad relativa elevadas; incremento en la sudoración, frecuencia respiratoria alta, vasodilatación con aumento del flujo sanguíneo a la superficie de la piel, incremento en la temperatura rectal, disminución de la ingesta de alimento, incremento en los requerimientos de energía de mantenimiento, etc. todas estas respuestas se asocian con el impacto negativo del estrés por calor en la producción y reproducción en animales de granja (Ganaie, 2012; Bunglavan y Chaturvedi, 2013).

#### **4.2.2 Efectos del estrés por calor en producción animal**

Los efectos perjudiciales del estrés por calor sobre el bienestar y la producción de los animales probablemente se convertirán en un problema si el clima de la tierra continúa calentándose como se mencionó anteriormente. Hoy en día, es preocupante el estrés inducido en ambientes muy cálidos como el que se

---

observa en zonas tropicales, subtropicales y áridas debido a su impacto perjudicial, especialmente en animales de alto rendimiento (Slimen *et al.*, 2016).

La industria porcina es afectada severamente por el estrés por calor; estudios hechos en Estados Unidos demuestran que en ese país se pierden más de \$ 300 millones de dólares anuales, y las pérdidas mundiales están en los miles de millones (St-Pierre *et al.*, 2003). Parte de la pérdida económica se debe al aumento de la morbilidad, mortalidad (especialmente en el peso de mercado de los cerdos), el crecimiento subóptimo, el uso ineficaz de nutrientes, el bajo rendimiento de las cerdas, la disminución del valor de la canal (canales con alto contenido de grasa) y problemas por procesamiento de la canal (St-Pierre *et al.*, 2003). El hecho de que los cerdos criados bajo condiciones de estrés por calor hayan reducido la masa muscular y aumentado el tejido adiposo se ha documentado con frecuencia durante los últimos años (Close *et al.*, 1971, Collin *et al.*, 2001).

Aparte de los efectos directos sobre el metabolismo y fisiología del animal, gran parte de los efectos perjudiciales del cambio climático en la producción animal global estará mediada indirectamente por la disponibilidad y calidad de los alimentos y el aumento de la susceptibilidad a parásitos y enfermedades transmitidas por vectores (Baumgard *et al.*, 2013). Es probable que el cambio climático limite la disponibilidad de pasto y forraje para el ganado debido a la disminución del rendimiento producido por el calor, la sequía y al elevado nivel de CO<sub>2</sub> (Baumgard *et al.*, 2012). Además, se prevé que el calentamiento global afecte la biodiversidad y la distribución de la microbiota, lo que probablemente aumentará la aparición de agentes zoonóticos y brotes de enfermedades infecciosas (Sachan y Singh, 2010).

Por consiguiente, el estrés por calor podría convertirse en uno de los problemas más costosos y ciertamente uno de los principales obstáculos para los productores de animales en los países en desarrollo (Baumgard *et al.*, 2013).

### **4.2.3 Efecto del estrés por calor en el epitelio intestinal**

El daño influido a los animales que padecen estrés por calor puede comprometer la integridad de la mucosa gastrointestinal, misma que protege al ambiente interno del organismo de las bacterias y endotoxinas bacterianas (Moseley y Gisolfi 1993). En general, se ha reportado que la respuesta al estrés por calor disminuye la función de esta barrera protectora, dando lugar al aumento de la permeabilidad intestinal y la difusión de componentes bacterianos tóxicos desde el lumen del intestino hacia la sangre (Lambert, 2009).

El estrés por calor altera la homeostasis epitelial en la mucosa intestinal por inhibición de la mitosis y la inducción de apoptosis en la cripta (Varedi *et al.*, 2001, Prosser *et al.*, 2004). Además, este tipo de estrés causa varios cambios en el tracto gastrointestinal, los cuales incluyen daño notable en la superficie de las vellosidades intestinales, así como reducción en la altura de las vellosidades y profundidad de criptas de mucosa intestinal, lo que en consecuencia reduce su capacidad de absorción de nutrientes, tal como lo reportaron Yu *et al.* (2010) en los cerdos y Soleimani *et al.* (2010) en aves.

### **4.2.4 Efecto del estrés por calor en la microbiota intestinal**

El tracto gastrointestinal de los mamíferos está habitado por más de 400 especies de bacterias y el número total de microbios es de aproximadamente  $10^{14}$  que es aproximadamente 10 veces más que las células de su tejido (Hooper y Gordon, 2001; Hooper 2004; Kelly *et al.*, 2007). Por lo anterior, la diversidad genética de la microbiota en el tracto gastrointestinal es inmensa y tiene el potencial de proporcionar numerosas actividades biológicas de las que el huésped carece (Isaacson y Bum, 2012). La microbiota gastrointestinal forma un complejo sistema ecológico que ejerce funciones específicas tróficas, metabólicas y protectoras para el huésped (Guarner y Malagelada, 2003). La biodiversidad y la estabilidad de este ecosistema benefician no sólo la utilización de nutrientes en los

---

animales, sino también el estado de salud y rendimiento en el crecimiento (Jensen, 1998).

Algunos estudios han demostrado que las condiciones estresantes y cambios nutricionales podrían alterar la población microbiana gastrointestinal, lo que conduce a efectos perjudiciales en el huésped (Fuller, 1989; Lv *et al.*, 2015). El estrés compromete la microbiota intestinal y disminuye la capacidad de respuesta inmune del organismo y el sistema de defensa antioxidante en cerdos destetados (Morrow-Tesch *et al.*, 1994; Gruenwald *et al.*, 2002). Debido a que la estabilidad de la microbiota intestinal determina la capacidad del organismo para tolerar el estrés (Berg *et al.*, 1999), se espera que modulando la microbiota intestinal, se podría ofrecer un enfoque terapéutico novedoso y no invasivo para promover el bienestar del huésped mediante la prevención y el tratamiento de los efectos adversos del estrés térmico en el intestino (Moore *et al.*, 2014).

### 4.3 Probióticos: Concepto

Se han propuesto varias definiciones para el término "probiótico", cuyo origen se atribuye a Parker (1974) que los define como «organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal». Sin embargo, el concepto de manipulación de la microbiota fue apreciado por primera vez por Metchnikoff (1912), quien consideró que el consumo de yogur por los campesinos búlgaros les confería un largo período de vida. Aunque no se ha demostrado la existencia de un vínculo entre la longevidad y la ingestión de leche fermentada, algunos autores han afirmado que su valor terapéutico está relacionado con las bacterias viables, en particular *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (Sissons, 1989). Por otro lado, en literatura más reciente la definición más aceptada es "microorganismos vivos, que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped" (FAO/OMS, 2002). Esta definición implica que se debe demostrar un efecto para la salud por parte del probiótico (Patil *et al.*, 2015).

### 4.3.1 Microorganismos probióticos comúnmente usados

Un elevado número de cepas de microorganismos se están utilizando como probióticos con diferente eficacia; algunos de ellos pueden proporcionar ciertos beneficios para el huésped mientras que otros no (Weichselbaum, 2009). Las especies de probióticos más comúnmente usadas son cepas de bacterias lácticas como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*. Estas especies pueden resistir el ácido gástrico y biliar además tener la capacidad de colonizar el intestino o presentar antagonismo con microorganismos potencialmente patógenos (Verdenelli *et al.*, 2009). Los microorganismos más utilizados como probióticos en producción animal son *Lactobacillus- acidophilus*, *casei*, *brevis*, *fermentum*, *gallinarum*, *plantarum*, *gasseri*, *johnnsonii*, *reuteri*, *salivaris*, *Bifidobacterium- bifidum*, *lactis*, *Saccharomyces- cerevisiae*, *boulardii*, *Aspergillus- oryzae*, *Bacillus- cereus*, *Coagulans*, *licheniformis*, *subtilis*, *Enterococcus- faecium* y *Pediococcus pentosaceus* (Ohashi y Ushida, 2009).

### 4.3.2 Modo de acción

La microbiota intestinal normal tiene un papel de apoyo en la protección contra enfermedades y en la digestión de los alimentos. Sin embargo, las condiciones estresantes pueden favorecer el crecimiento de organismos patógenos (Patil *et al.* 2015). De acuerdo con Escalante (2001), los probióticos producen sus efectos benéficos a través de uno de los siguientes mecanismos:

- a) Reducción del pH intestinal debido a los ácidos excretados por los microorganismos probióticos, lo que evita la proliferación de los patógenos.
- b) Efecto competitivo de los probióticos que puede deberse a la ocupación de los lugares de colonización.
- c) Capacidad de secreción de antibióticos naturales por los lactobacilos y bacterias bifidogénicas, que pueden tener un amplio espectro de actividad, entre ellos: lactocinas, helveticinas, lactacinas, curvacinas, nicinas y bifidocinas.

### 4.3.3 Uso y función de probióticos en cerdos

El aumento en la presión para que los productores ganaderos reduzcan al mínimo el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en la producción animal provoca una preocupación mundial que ocurre por el desarrollo de la resistencia bacteriana a antibióticos (FAO/OMS, 2002). En consecuencia, se está trabajando para encontrar alternativas viables al uso de antibióticos, lo que podría mejorar los mecanismos naturales de defensa de los animales y reducir el uso masivo de los antibióticos (Bach, 2001; Smith *et al.*, 2002). Tradicionalmente, los antibióticos se han administrado ampliamente en la producción de cerdos para resolver problemas posteriores al destete (Kong *et al.*, 2009). Autores como Jacela *et al.* (2010) mencionan que la suplementación de microorganismos benéficos en el tracto gastrointestinal es una alternativa potencial para eliminar microorganismos potencialmente dañinos. En animales sanos, se mantiene un delicado equilibrio entre microorganismos benéficos y dañinos, sin embargo, durante períodos de estrés, el equilibrio puede afectarse y conducir a un rápido crecimiento de microorganismos patógenos. Lo anterior, resultaría en mal desempeño o enfermedades en el animal (Jacela *et al.*, 2010). En este contexto, los probióticos han sido objeto de investigación para reemplazar el uso de antibióticos como promotores del crecimiento, siendo un desafío importante para los productores el criar lechones sanos sin suplementar antibióticos (Dowarah *et al.*, 2017).

En diversos trabajos como los de Huang *et al.*, (2004) y Lee *et al.*, (2012), mencionan que el uso de probióticos en la producción de cerdos ayuda a mantener una buena salud intestinal al estimular el crecimiento de microbiota sana, previniendo la colonización intestinal de patógenos entéricos; así también se reduce la emisión de gases nocivos fecales (Hong *et al.*, 2002); producción de sustancias antimicrobianas, mejora la capacidad digestiva y la respuesta inmune mediada por anticuerpos (Wang *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2015). Algunos microorganismos del género *Bacillus* han empleado como probióticos, y han

demostrado que su inclusión en la dieta reduce la morbilidad y la mortalidad en lechones recién destetados, mejorando los parámetros de desempeño de los cerdos de engorde y la calidad de la canal (Alexopoulos *et al.*, 2004<sup>a</sup>). La mayoría de esos estudios, revelan un resultado benéfico con la administración de probióticos en lechones, mejorando el número de bacterias benéficas y disminuyendo la carga de patógenos; además desempeña un papel importante en la estimulación de la respuesta inmune celular, mostrando altas actividades de IgM e IgA hacia patógenos disminuyendo la infección o un alivio parcial de la diarrea (Gaggia *et al.*, 2010 y Deng *et al.*, 2013).

#### **4.3.4 Uso de *Bacillus subtilis* como probiótico en cerdos y otras especies**

*Bacillus subtilis* ha sido evaluado como probiótico para su uso en cerdos y otras especies como pollos de engorde, gallinas de postura y peces; mostrando algunos beneficios para aves como aumentar las tasas de crecimiento (Afsharmanesh y Sadaghi, 2014), mejora en la digestibilidad ileal aparente de aminoácidos, reducción de la gravedad de las lesiones intestinales y número de células patógenas en el TGI, reconstitución de la estructura normal de las vellosidades intestinales que han sido afectadas por enteritis necrótica causada por *Clostridium perfringens* (Jayaraman *et al.*, 2013) y del mismo modo, una reducción en la coccidiosis (Giannenas *et al.* 2012), consideradas como enfermedades importantes en aves de corral debido a las altas pérdidas económicas que provoca en la industria (McDevitt *et al.*, 2006, Hermans y Morgan, 2007). En el caso de gallinas ponedoras, se ha encontrado un efecto en la reducción del colesterol en la yema de huevo (Kurtoglu *et al.*, 2004).

Los resultados encontrados en cerdos con el uso de *Bacillus subtilis* han sido entre otros, un aumento de peso en hasta un 8% y la eficiencia en el uso de los alimentos hasta un 10% en cerdos productores y finalizadores, mejora el metabolismo de los lípidos en la grasa subcutánea mediante la regulación de la microbiota intestinal (Alexopoulos *et al.*, 2004<sup>a</sup>; Cui *et al.*, 2013), cerdas gestantes de dos semanas antes de la fecha de parto esperada y durante la lactancia

tuvieron un mayor rendimiento de la camada, reducción de diarrea en los lechones, redujo la mortalidad antes del destete y aumentó el peso corporal al destete (Alexopoulos *et al.* 2004<sup>b</sup>). La disminución de la pérdida de peso en cerdas durante la lactancia y la producción de leche con mayor contenido de grasa y proteínas fueron razones sugeridas para mejorar la salud y el rendimiento de los lechones. Alexopoulos *et al.*, (2004<sup>a</sup>), y Link y Kovac (2006) han demostrado que en lechones, la ingestión de esporas de *Bacillus subtilis* aumenta el rendimiento del crecimiento, la conversión alimenticia y la calidad de la carne de los cerdos.

En algunas especies de peces, mejora la respuesta inmune y resistencia ante infecciones, aumenta el crecimiento, producción y supervivencia de larvas, reduce el recuento de patógenos (Ghosh *et al.*, 2008) (Keysami *et al.*, 2007). De manera similar, Liu *et al.* (2010) informó que el desarrollo de larvas de camarón (*L. vannamei*), la metamorfosis, la inmunoestimulación y la respuesta al estrés se aceleró significativamente después de la adición de *B. subtilis* al agua de cría de larvas.

El uso de especies de *Bacillus* como probióticos ha aumentado rápidamente, demostrando que éste es capaz de estimular la respuesta inmune, las actividades antimicrobianas y la exclusión competitiva de otros microorganismos (Cutting, 2011). Teniendo en cuenta que en condiciones de estrés por calor el tracto gastrointestinal sufre daños que comprometen su integridad y función (Pearce *et al.*, 2013), y probablemente la composición de su microbiota, el uso de *Bacillus subtilis* podría conferir la ventaja de ejercer una simbiosis única en cerdos en crecimiento.

#### **4.3.5 Características microbiológicas del *Bacillus subtilis***

Desde el punto de vista microbiológico los *Bacillus* son microorganismos grampositivos, formadores de esporas, comúnmente asociados con el suelo, el agua y el aire, que normalmente son introducidos al tracto intestinal como resultado de una ingestión involuntaria de alimentos con estas bacterias (Gaggia *et al.*,

2010). Los *Bacillus* bacterias anaerobias estrictas o facultativas, productoras de sustancias antimicrobianas, así como de enzimas hidrolasas. Entre las especies de mayor importancia, como probióticos pertenecientes a este género, están *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. natto* (Guillot, 2000; y Bortolozzo Kira, 2002). Otros de los elementos que caracteriza a *Bacillus sp.* es la producción de enzimas hidrolíticas que ayudan a mejorar la utilización de los alimentos. Dentro de estas se encuentran las proteasas, amilasas y glicosidasas, que descomponen las complejas moléculas de los alimentos y las transforman en nutrientes más simples. Estos compuestos se absorben rápidamente por el animal o pueden ser empleados por otras bacterias benéficas para el establecimiento de una microbiota intestinal balanceada (Milian *et al.*, 2008).

*B. subtilis* es un microorganismo autóctono del suelo que a diferencia de *Escherichia coli*, prospera en la naturaleza, donde se encuentra ampliamente distribuido en muy diversos hábitats y los cuales ha colonizado eficientemente debido a sus cualidades, como capacidad para formar esporas en diversas condiciones de estrés, crecer en un intervalo amplio de temperaturas (desde 15 hasta 55 °C), presentar motilidad, aerotaxis y velocidades de crecimiento altas, sobrevivir en concentraciones salinas (hasta el 7% de NaCl), producir una amplia variedad de antibióticos y enzimas hidrolíticas extracelulares (Nakamura *et al.*, 1999). Su ciclo de vida, estudiado en el laboratorio, comprende una fase vegetativa muy similar al crecimiento de otras bacterias, sin embargo bajo condiciones de limitación de nutrientes, de densidad de población o de respuesta a condiciones de estrés, se generan una serie de señales que modulan el inicio de la esporulación (Espinosa, 2005). Las esporas que son termoestables tienen un número de ventajas sobre otras bacterias no esporo formadoras tales como *Lactobacillus* decir, que el producto puede ser almacenado a temperatura ambiente en una forma desecada sin ningún efecto deletéreo sobre su viabilidad. Una segunda ventaja es que la espora es capaz de sobrevivir al pH bajo de la barrera gástrica (Barbosa *et al.*, 2005; Spinosa *et al.*, 2000); así que en principio una dosis específica de esporas puede almacenarse indefinidamente sin

refrigeración y estas al ser ingeridas llegarán al intestino delgado intacto (Cutting, 2011).

*B. subtilis* además tiene la capacidad de adaptarse al ecosistema intestinal (Jensen *et al.*, 2003; Tam *et al.*, 2006), y puede tener un efecto potenciador del crecimiento del huésped basados en la producción de enzimas que mejoran la digestibilidad de la alimentación (Leser *et al.*, 2008).

## V. HIPÓTESIS

La suplementación con *B. subtilis* puede mejorar el comportamiento productivo, la estabilidad de la microbiota intestinal e integridad del epitelio del intestino delgado de cerdos en crecimiento en condiciones de estrés por calor.

## VI. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la suplementación de una cepa de *B. subtilis* originaria de intestino delgado de cerdos en estrés por calor crónico sobre el comportamiento productivo, estabilidad de la microbiota intestinal e integridad del epitelio de intestino delgado de cerdos en crecimiento en condiciones de estrés por calor.

### Objetivos específicos

- Determinar si el estrés por calor modifica la composición de la flora intestinal de cerdos en crecimiento.
- Comprobar si existe un efecto probiótico de *B. subtilis* al ser adicionado en dietas para cerdos en crecimiento.
- Evaluar el efecto de *Bacillus subtilis*, sobre la temperatura intestinal y la microbiota de intestino delgado de cerdos en crecimiento a los 2 y 8 días de exposición a estrés por calor.
- Evaluar el efecto de *Bacillus subtilis*, aislado de intestino delgado de cerdos adaptados al EC, en el comportamiento productivo, estabilidad de la microbiota e integridad del epitelio intestinal de cerdos en crecimiento bajo condiciones de estrés por calor.

## VII. EXPERIMENTO 1.

### **Efecto de la suplementación con *B. subtilis* en la temperatura intestinal y la composición de la microbiota de intestino delgado de cerdos en crecimiento en condiciones de estrés por calor**

#### **7.1 Objetivo**

Evaluar el efecto de *Bacillus subtilis*, sobre la temperatura intestinal y la microbiota de intestino delgado de cerdos en crecimiento a los 2 y 8 días de exposición a estrés por calor.

#### **7.2 Materiales y métodos**

El experimento se llevó a cabo durante el verano de 2016, el trabajo con los cerdos se realizó en la Unidad de Fisiología y Metabolismo de Cerdos; y los análisis de muestras en el Laboratorio de Nutrigenómica del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, en Mexicali, B.C., México.

Para el manejo y alojamiento de los animales, en la unidad de Fisiología y Metabolismo de Cerdos, se cuenta con dos salas con jaulas individuales de piso elevado y plastificado de 1.2 x 1.2 m, equipadas con comederos de acero inoxidable y bebederos tipo chupón. Una de las salas posee un equipo de aire acondicionado (sala de confort), en donde es posible ajustar el termostato para mantener la temperatura ambiental a la temperatura de confort de los cerdos (24°C); la otra sala, no posee equipo de aire acondicionado (sala de estrés por calor), la temperatura en esta sala refleja las variaciones diurnas de temperatura ambiental que ocurren en los días en que se realiza el experimento.

Antes del inicio del experimento se seleccionaron de la granja porcina del ICA, ocho cerdos, seis hembras y dos machos de cruce Landrace x Yorkshire x Duroc con un peso promedio inicial de  $18 \pm 2$  kg de peso vivo. Los cerdos fueron adaptados quirúrgicamente con una cánula tipo "T" en íleon terminal, y para su

---

recuperación de la cirugía se les mantuvo un período de recuperación de diez días en condiciones de confort (aire acondicionado encendido a 24 °C).

El período experimental tuvo una duración de 15 días, en los primeros siete días se mantuvieron las condiciones de confort térmico (24 °C), el octavo día en la mañana se apagó el aire acondicionado de la sala y los animales estuvieron sujetos a las variaciones diurnas de temperatura ambiente que ocurrieron de manera natural en los días de experimentación, esta segunda etapa se consideró el período de estrés por calor, y concluyó el día quince.

El trabajo consistió de dos tratamientos con 4 réplicas (cerdos) por tratamiento. En el tratamiento uno (T1) o grupo testigo, los cerdos fueron alimentados con la dieta a base de trigo adicionada con vitaminas y minerales; en el tratamiento dos (T2) o grupo experimental, los cerdos recibieron el mismo alimento que en T1, pero fueron suplementados con *Bacillus subtilis*.

La alimentación de los cerdos se restringió durante todo el experimento a 1.2 kg de alimento al día, dividido en dos raciones iguales de 600 gr ofrecido a las 0700 y 1900 horas. Para la suplementación de *B. subtilis* a los cerdos del T2 se les administraron 20 ml de medio de cultivo de esta bacteria sobre el alimento recién ofrecido tanto en la mañana como en la tarde; al mismo tiempo los cerdos del T1 recibieron el mismo volumen de medio de cultivo estéril. La dosis administrada de *B. subtilis* fue equivalente a  $2.16 \times 10^8$  UFC por día, similar a la que ya había sido reportada en la literatura (Baker *et al.*, 2013). La dieta ofrecida fue formulada para cubrir los requerimientos de nutrientes para mantenimiento de los cerdos de acuerdo con su edad y peso (NRC, 2012), tal como se muestra en el Cuadro 1. Se ofreció agua potable a voluntad.

A través de la cánula ileal de cada cerdo se introdujo un termógrafo (Thermotracker BT, iButtonLink Technology, Whitewater, WI) colocado dentro de una pequeña bolsa de nylon y atado al tapón de la cánula. Los termógrafos fueron programados para realizar lecturas de la temperatura intestinal cada 15 minutos.

Así mismo, se colocó un higrotermógrafo (Thermotracker Higo) dentro de la sala en donde se alojaron los animales para registrar la temperatura ambiental y humedad relativa cada 15 minutos, los resultados obtenidos de temperatura (en grados Fahrenheit) y humedad ambiental se emplearon para calcular el índice de calor dentro de cada una de las salas, de acuerdo con la fórmula propuesta por Steadman (1979) y modificada por Rothfusz (1990).

$$ITH = -42.379 + 2.0490T + 10.143RH - 0.22476TRH - 6.8378 \times 10^{-3} Tf^2 - 5.4817 \times 10^{-2} RH^2 + 1.2287 \times 10^{-3} Tf^2 RH + 8.5282 \times 10^{-4} RH^2 Tf - 1.99 \times 10^{-6} Tf^2 RH^2$$

(ITH, índice de temperatura-humedad; T, temperatura en grados Fahrenheit; RH, humedad relativa expresada en porcentaje).

**Cuadro 1.** Composición de la dieta experimental.

Ingrediente	gr/kg
Trigo	639.0
Soya	303.0
Carbonato de Calcio	12.5
Ortofosfato	10.0
Sal común	3.5
Premezcla de vitaminas y minerales	2.0
Aceite	30.0
Total	1000

### 7.2.1 Preparación del suplemento de *B. subtilis*

La cepa de *B. subtilis* utilizada fue aislada e identificada previamente del contenido intestinal de cerdos que estuvieron sometidos y adaptados a condiciones de estrés por calor durante varias semanas en un experimento anterior. La identificación se realizó mediante una prueba de PCR punto final con oligonucleótidos universales 16s, los productos de PCR se enviaron a secuenciar para su identificación con oligonucleótidos específicos de *B. subtilis* y compararon el GenBank.

Una alícuota de 200 µl de cultivo puro de *B. subtilis* fue sembrado en 200 ml de medio de cultivo líquido LB durante 12 horas a 37 °C. De este medio se

guardaron 30 alícuotas de 1.0 ml del cultivo a  $-81^{\circ}\text{C}$ , del cual también se leyó su absorbancia a 540 nm mediante espectrofotometría. A continuación, la concentración de microorganismos se determinó sembrando 100  $\mu\text{l}$  del cultivo diluido 1:10,000 en 8 cajas de medio LB agar, durante 12 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al finalizar esta incubación se realizó el conteo de UFC por caja, mismo que se multiplicó por su factor de dilución. Con este resultado se estimó el número promedio de UFC de *B. subtilis* por ml de medio de cultivo que se emplearía en el experimento.

En cada día del experimento se sembró una alícuota de medio de cultivo de *B. subtilis* durante 12 horas (toda la noche) para ser suministradas al día siguiente. La cantidad de microorganismos fue corroborada de forma que al momento de su administración el medio de cultivo tuviera la absorbancia a 540 nm equivalente a  $1.08 \times 10^8$  UFC por ml.

Todos los días al momento de servir el alimento se esparcieron sobre el mismo ya fueran 20 ml de medio de cultivo líquido con *B. subtilis* para los animales del T2 (mañana y tarde), o bien medio de cultivo estéril para el grupo testigo. En total, la cantidad de microorganismos suministrada por día a los cerdos del T2 equivalían a  $2.16 \times 10^8$  UFC de *B. subtilis*.

### **7.2.2 Toma de muestras de contenido ileal**

En el último día de confort y en los días 2 y 8 de exposición a estrés por calor se colectó el contenido ileal de los cerdos durante un período de 12 h consecutivas, comprendido de las 0700 a las 1900 h. La colecta del material se realizó colocando bolsas de plástico en la salida del barril de la cánula durante 15 minutos o hasta que se llenaron, y sustituyéndolas por bolsas nuevas. Todo el material colectado de un mismo animal se vació en un recipiente, fue mezclado y conservado en congelación para análisis de composición de la microbiota intestinal.

### **7.2.3 Extracción de ADN de muestras de contenido ileal**

El contenido ileal colectado durante el trabajo de campo fue homogenizado y se formaron alícuotas de 2 ml en tubos eppendorf. De estas muestras se realizó la extracción de ADN genómico para los análisis de PCR cuantitativo, como se describe a continuación.

De las alícuotas de contenido intestinal de los cerdos se tomó 1 ml de cada muestra, mismas que fueron centrifugadas por 2 min a 4000 g. Del producto de centrifugación se retiraron 100 µl de sobrenadante.

A los 100 µl de muestra se agregó 1 ml de DNAzol (Invitrogen, USA) y se mezcló por inversión y luego se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente con la finalidad de lisar las células bacterianas. A continuación las muestras se centrifugaron a 4000g durante 2 min y se recuperó el sobrenadante. Se precipitó con 500 µl de etanol al 100% y se mezcló por inversión durante 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 4000 g por 2 min y se retiró el sobrenadante, el pellet que quedó fue lavado con 800 µl de etanol al 75%, mezclándolo por inversión por 1 min, se realizó una segunda centrifugación a 4000g durante 2 min retirando de nuevo el sobrenadante y dejando secar la pastilla de DNA por 5 minutos. La pastilla de DNA fue suspendida en agua libre de nucleasas (de 20 µl a 50 µl). Para corroborar el resultado se corrió la muestra en una prueba de electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %.

### **7.2.4 Determinación de las variaciones en la microbiota intestinal**

La abundancia de ADN de microorganismos de los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *E. coli*, *Bifidobacterium*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Shigella* y *Klebsiella* en los d0, d2 y d8 de exposición al estrés por calor se estimó mediante ensayos de PCR cuantitativo (qPCR). Con este fin se empleó el ADN genómico purificado en las muestras de contenido intestinal y se emplearon oligonucleótidos específicos para cada género bacteriano, así también se emplearon oligonucleótidos universales para bacterias totales 16S. En el Cuadro 2 se

presentan los oligonucleótidos utilizados. El análisis de qPCR se llevó a cabo con 1 µl de ADN de cada muestra (concentración de 50 ng/µl), 1 µl de los oligonucleótidos específicos para cada género bacteriano, se agregaron 12.5 µl de SYBR Green Supermix (Máxima TM SYBR Green-rox qPCR Master 2X, Fermentas, Inc. USA; esta mezcla tiene la enzima ADN polimerasa, un buffer de MgCl<sub>2</sub> y el Fluroro SYBR Green). Finalmente la reacción fue completada en un volumen de 25 µl con agua libre de nucleasas. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un termociclador Chromo 4 Real-Time PCR detector de Bio-Rad y se realizaron de acuerdo con el programa presentado en el Cuadro 3.

**Cuadro 2.** Secuencias de oligonucleótidos empleados para el análisis de composición microbiológica de contenido intestinal de cerdos en crecimiento en condiciones de estrés por calor.

	Secuencia	Referencia
<b><i>Bacillus sp</i></b>		
Sentido	ACGCCGTAACGATGAGT	Han <i>et al.</i> , 2012
Antisentido	GTGTGTAGCCAGGTCATAA	
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
Sentido	AGAAGCTTGCTCTTTGCTGA	Lee <i>et al.</i> , 2010
Antisentido	CTTTGGTCTTGCGACGTTAT	
<b><i>Lactobacillus sp.</i></b>		
Sentido	CGATGAGTGCTAGGTGTTGGA	Fu <i>et al.</i> , 2006
Antisentido	CAAGATGTCAAGACCTGGTAAG	
<b><i>Bifidobacterium sp.</i></b>		
Sentido	GATTCTGGCTCAGGATGAACG	Kaufmann <i>et al.</i> , 1997
Antisentido	CGGGTGCT(A/G/C/T)CCCACTTTCATG	
<b><i>Salmonella sp.</i></b>		
Sentido	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA	Rahn <i>et al.</i> , 1992
Antisentido	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	
<b><i>Clostridium perfringens</i></b>		
Sentido	ATGCAAGTCGAGCGA(G/T)G	Rinttila <i>et al.</i> , 2004
Antisentido	TATGCGGTATTAATCT(C/T)CCTTT	
<b><i>Shigella spp</i></b>		
Sentido	CCTTGACCGCCTTTCCGATA	Kong <i>et al.</i> , 2002
Antisentido	CAGCCACCCTCTGAGGTA	
<b><i>Klebsiella ssp</i></b>		
Sentido	CGCGTACTATACGCCATGAACGTA	Brisse y Verhoef 2001
Antisentido	ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG	
<b>Totales</b>		
Sentido	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	Nadkarni <i>et al.</i> , 2002
Antisentido	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	

**Cuadro 3.** Condiciones de amplificación para las muestras de qPCR.

Etapa	Tiempo	Temperatura (°C)	Ciclos
Desnaturalización inicial	3 min	95	
Desnaturalización	30 seg	95	39 ciclos
Alineación	30 seg	58	
Elongación	1 min	72	
Elongación final	5 seg	65-95	
Incubación	Indefinido	10	

### 7.2.5 Determinación de la presencia de genes de antibióticos en *B. subtilis*

La presencia de ARN de productos antimicrobianos (Subtilosina, Subtilisina, Iturina A, Fegycina FND, Bacilomycina y Surfactina) se estimó mediante ensayos de PCR punto final (PCR). Con este fin se empleó el ADN genómico purificado de la cepa de *B. subtilis* utilizada en el experimento y se emplearon oligonucleótidos específicos para cada producto. En el Cuadro 4 se presentan los oligonucleótidos utilizados. Las reacciones de PCR con volumen final de 50 µl se prepararon en microtubos de 0.2 ml, de la siguiente manera: 40.5 µl de agua libre de nucleasas; 1 µl DNTP's (10 µM); 5 µl buffer 5X para PCR, 1 µl de oligonucleótido antisentido y 1 µl de oligo sentido (10 µM), 0.5 µl de enzima ADN polimerasa (5 U/µl) y 1 µl de ADN genómico. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Thermal cycler T100 de BIO-RAD), con el programa siguiente: las temperaturas de amplificación empleadas fueron de 52 a 58 °C, dependiendo de la temperatura de desnaturalización (TM) de los oligonucleótidos específicos para cada fragmento amplificado. Todas las reacciones de PCR fueron realizadas con 35 ciclos de amplificación. Una vez terminada la amplificación, se verificó el producto de PCR mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 2 % con 3 µl de producto de PCR y 2 µl de buffer de corrida. Lo anterior se realizó de acuerdo con el programa presentado en el Cuadro 5.

### 7.2.6 Análisis estadístico

Los resultados de temperatura se compararon mediante análisis de varianza en el programa Statistix 9.0. Los resultados de cuantificación de DNA se

analizaron siguiendo la metodología de 2-DDCt descrita por Livak y Schmittgen (2001); de acuerdo con estos autores, los valores de Ct de cada muestra fueron corregidos con el Ct de los amplificadores con el oligonucleótido de bacterias totales 16S para realizar el análisis estadístico. Se contrastó el efecto de la suplementación o no con *B. subtilis* en los d0, d2 y d8 de exposición a estrés por calor. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P < 0.05$ .

**Cuadro 4.** Secuencias de oligonucleótidos empleados para el análisis de la presencia de genes de antibióticos en cepa de *B. subtilis*

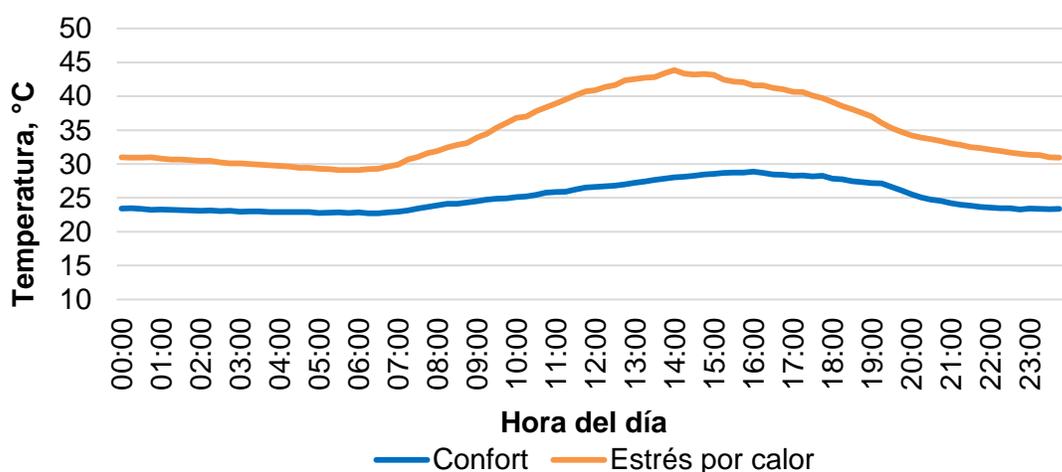
	Secuencia	Tamaño de fragmento	Referencia
<b>Subtilisin</b>			
Sentido	CTTAAACGTCAGAGGCGGAG	704 pb	Cao <i>et al.</i> , 2002
Antisentido	ATTGTGCAGCTGCTTGTACG		
<b>Subtilosin</b>			
Sentido	TCGGTTTGTAACCTTCAACTGC	334 pb	Cao <i>et al.</i> , 2002
Antisentido	GTCCACTAGACAAGCGGCTC		
<b>Bacillomycin</b>			
Sentido	CTGGAAGAGATGCCGCTTAC	850 pb	Cao <i>et al.</i> , 2002
Antisentido	AAGAGTGCGTTTTCTTCGGA		
<b>Iturin ituA</b>			
Sentido	TGCCAGACAGTATGAGGCAG	885 pb	Joshi y Gardener (2006)
Antisentido	CATGCCGTATCCACTGTGAC		
<b>Fengycin fenD</b>			
Sentido	CCTGCAGAAGGAGAAGTGAAG	293 pb	Joshi y Gardener (2006)
Antisentido	TGCTCATCGTCTTCCGTTTC		
<b>Surfactin</b>			
Sentido	GTTCTCGCAGTCCAGCAGAAG	308 pb	Joshi y Gardener (2006)
Antisentido	GCCGAGCGTATCCGTACCGAG		

**Cuadro 5.** Condiciones de amplificación para las muestras de PCR.

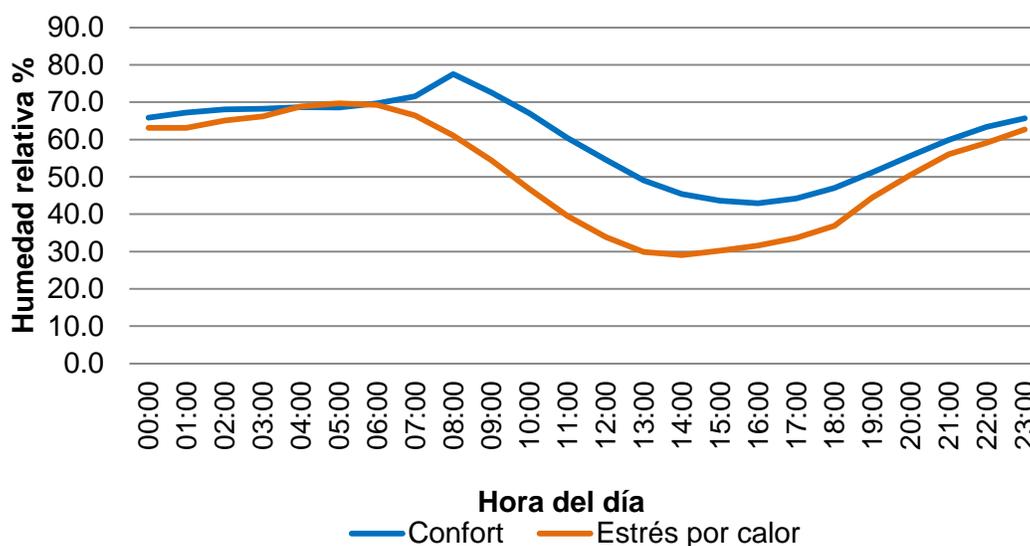
Etapa	Tiempo	Temperatura (°C)	Ciclos
Desnaturalización inicial	5 min	94	35 ciclos
Desnaturalización	30 seg	94	
Alineación	45 seg	52-58	
Elongación	1 min	72	
Elongación final	7 min	72	
Incubación	Indefinido	10	

### 7.3 Resultados y discusión

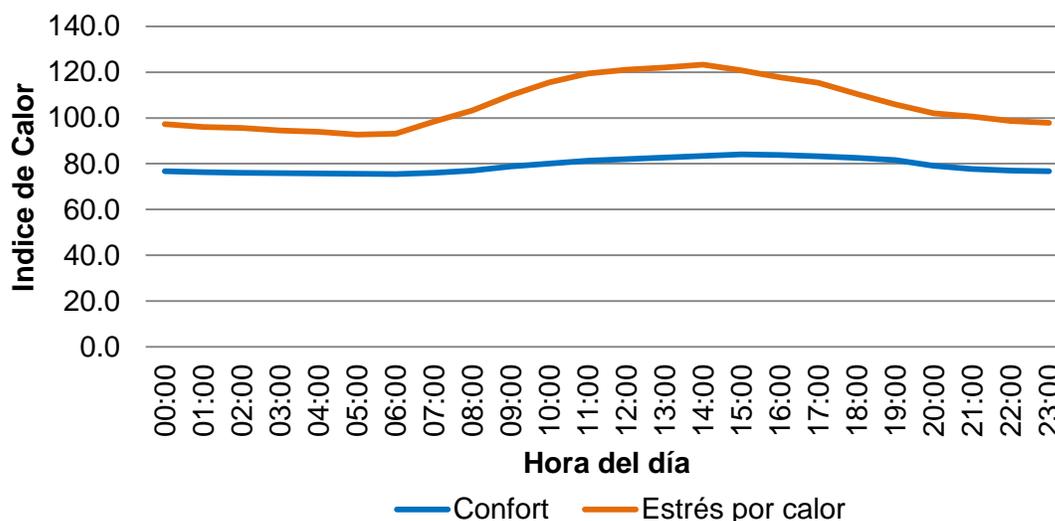
Durante el periodo experimental se registraron las variaciones diurnas de temperatura ambiental y humedad relativa dentro de la sala en que fueron alojados los cerdos (Figura 2 y 3). La temperatura ambiental durante el período de confort fue de  $25.1 \pm 2.1$  °C, mientras que en el periodo de estrés por calor la temperatura ambiental fue en promedio de  $35.0 \pm 4.9$  °C. El horario en que se registró la mayor temperatura fue de 1000 a 1900 h, en ese período la temperatura ambiental fue superior a 35 °C con un promedio de 40.3°C. Por otra parte, la humedad relativa presentó valores promedio en confort y estrés por calor de  $60.3 \pm 10.6$  % y  $51.3 \pm 14.7$  % respectivamente, con los valores máximos entre 0700 y 0900 horas. El índice de calor (Figura 4), en la sala de confort se mantuvo en un promedio de 80, pero en estrés por calor fue superior a 90 entre las 2200 y 0700 h, y superior a 100 entre 0800 y 2100 h, considerados respectivamente como de cuidado extremo y peligroso (NOAA, 2017). Las diferencias ambientales bajo los escenarios en que fueron expuestos los cerdos evidencian que estos se encontraban en condiciones de estrés por calor, teniendo en cuenta que la temperatura de confort para cerdos en crecimiento oscila alrededor de los 24 °C (Quiniou *et al.*, 2001).



**Figura 2.** Promedio de la temperatura ambiental a lo largo del día durante los períodos de confort o estrés por calor.



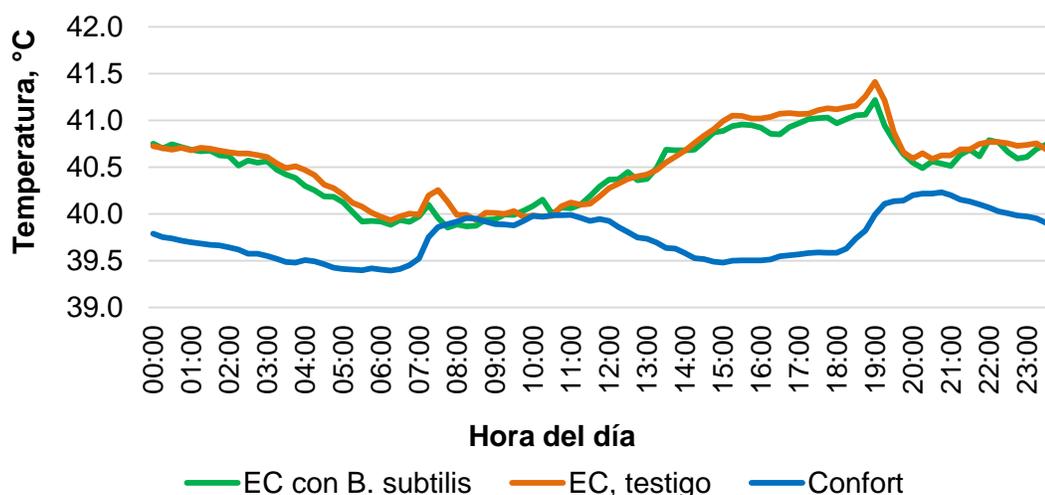
**Figura 3.** Promedio de la Humedad relativa a lo largo del día durante los períodos de confort o estrés por calor.



**Figura 4.** Variación promedio a lo largo del día en el índice de calor durante los períodos de confort o estrés por calor.

En la Figura 5 se presentan los promedios de temperatura intestinal de los cerdos en los períodos de confort y estrés por calor, registrados cada 15 min, a lo largo del día (24 horas), ya fueran suplementados o no con *B. subtilis*. Se observó un incremento promedio de 0.78 °C en la temperatura intestinal de los cerdos en

estrés por calor con relación a cuando se mantuvieron en condición de confort ( $P < 0.001$ ). Además, durante las horas más cálidas del día se observó un incremento de hasta  $1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  en la temperatura intestinal de los cerdos en estrés por calor. Sin embargo, durante el período de estrés por calor no se observó efecto de la suplementación con *B. subtilis* en la temperatura intestinal de los cerdos ( $P = 0.211$ ) (Cuadro 6). Aunque los cerdos son capaces de mantener su temperatura corporal relativamente constante dentro de cierto rango de condiciones de carga térmica del cuerpo (Adair y Black, 2003), variables ambientales como temperatura ambiental, radiación, humedad y velocidad del aire podrían afectar la producción y disipación de calor corporal en animales sanos, lo que aplica también al incremento de la temperatura intestinal en los cerdos durante el periodo de estrés por calor. Autores como Arce *et al.*, (2013) mostraron resultados similares, en donde la temperatura intestinal se eleva en alrededor  $1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante la exposición de cerdos a temperatura ambiental elevada; en consecuencia, se especula que la fisiología intestinal de los cerdos podría verse afectada.



**Figura 5.** Temperatura intestinal de los cerdos durante el período de confort, o en el período que fueron alimentados con la dieta testigo o suplementados con *B. subtilis*.

**Cuadro 6.** Temperatura intestinal de los cerdos durante el período de confort, o en el período que fueron alimentados con la dieta testigo o suplementados con *B. subtilis* en estrés por calor.

	Confort		Estrés por calor		Contrastes P <sup>a</sup> =			
	Sin <i>B. subtilis</i>	Sin <i>B. subtilis</i>	Con <i>B. subtilis</i>		C1	C2	C3	C4
Media	39.86	40.54	40.49		0.000	0.000	0.000	0.211
EE	0.066	0.066	0.046					

<sup>a</sup> Contrastes: C1: Con *B. subtilis* VS Sin *B. subtilis*

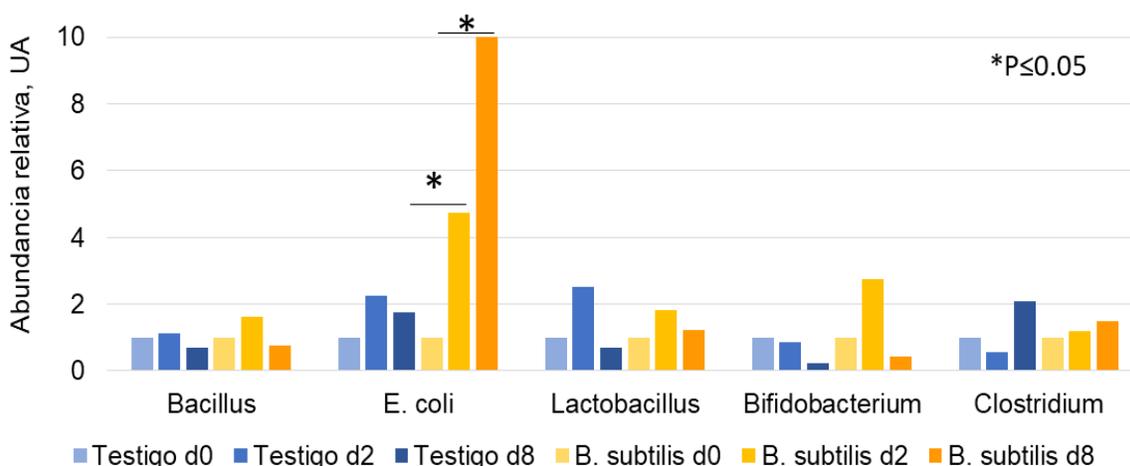
C2: Confort VS Estrés por calor

C3: Confort sin *B. subtilis* VS Estrés por calor con *B. subtilis*

C4: Estrés por calor sin *B. subtilis* VS Estrés por calor con *B. subtilis*

En la Figura6 se muestran los resultados de análisis de abundancia de microorganismos en intestino delgado de cerdos en confort (d0), y al d2 y d8 de exposición a estrés por calor consumiendo la dieta testigo o la dieta suplementada con *B. subtilis*. En los animales suplementados con *B. subtilis* se incrementó cinco veces la población de *E. coli* al d2 (P=0.050) y diez veces en el d8 (P=0.006) de exposición a estrés por calor. En los animales no suplementados, no hubo diferencias en la variación de *E.coli* a los días 2 y 8 de EC (P=0.288) y (P=0.461) respectivamente. No se observaron cambios en la población del resto de los microorganismos analizados por efecto del estrés por calor, ni por la suplementación con *B. subtilis* (P>0.10).

Algunos estudios han demostrado que las condiciones estresantes y cambios nutricionales podrían alterar la población microbiana gastrointestinal, lo que conduce a efectos perjudiciales en el huésped (Fuller, 1989; Lv *et al.*, 2015). Por ejemplo, se ha detallado que el estrés compromete la microbiota intestinal y como resultado, disminuye la capacidad de respuesta inmune del organismo y el sistema de defensa antioxidante en cerdos destetados (Morrow-Tesch *et al.*, 1994; Gruenwald *et al.*, 2002). Debido a que la estabilidad de la microbiota intestinal determina la capacidad del organismo para tolerar el estrés (Berg *et al.*, 1999), se espera que modulando la población microbiana intestinal, se pueda ofrecer un enfoque terapéutico novedoso y no invasivo para promover el bienestar de los cerdos mediante la prevención y el tratamiento de los efectos adversos del estrés térmico en el intestino.



**Figura 6.** Variaciones en la abundancia relativa al día 0 de microorganismos intestinales analizados en cerdos alimentados con la dieta testigo o con la suplementación de *B. subtilis* en los días 2 y 8 de exposición al estrés por calor.

De acuerdo con Alexopoulos *et al.* (2004<sup>a</sup>), se hipotetizó que el uso de un microorganismo que ha sido probado como probiótico podría ayudar a mantener la salud intestinal y estimular el crecimiento de otros microorganismos benéficos, previniendo la colonización de patógenos entéricos, sin embargo los resultados de este trabajo no mostraron el efecto esperado en la condición de estrés por calor en que se encontraban los cerdos.

*E. coli* es habitante normal del tracto gastrointestinal, además de otros microorganismos que colonizan rápidamente desde una etapa temprana en los cerdos, tales como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* y *Bifidobacterium* (Jensen *et al.*, 2001). Según Hartl y Dykhuizen (1984) *Escherichia coli* son en su mayoría bacterias comensales en el tracto gastrointestinal y se observan tanto en cerdos sanos como enfermos (Schierack *et al.*, 2006), por lo que algunas cepas de esta bacteria que se asocian a menudo con enfermedades en cerdos, puede diferir geográficamente (Vu-Khac *et al.*, 2007) y el grado de patogenicidad puede no ser idéntico incluso dentro de la misma cepa (Zhang *et al.*, 2007). Lo anterior hace pensar que no necesariamente el cambio en la población *E. coli* en el presente trabajo sea perjudicial para el cerdo, además de

---

que los cerdos que mostraron este aumento de *E. coli*, no presentaron ningún síntoma de enfermedad asociada con este microorganismo.

Se ha descrito que la capacidad de unión de algunas bacterias ha sido probada *in vitro* e *in vivo*, los resultados sugieren que el patógeno se desplaza por la competencia que ejercen bacterias benéficas por sitios receptores bacterianos, por la síntesis de sustancias similares a antibióticos y/o la escasez de sustratos esenciales (Verschuere *et al.*, 2000). Por lo anterior se puede pensar que la adición de *B. subtilis* no tuvo suficiente competitividad o adhesión en la mucosa intestinal bajo las condiciones de estrés por las temperaturas elevadas del periodo experimental. Estudios como los de Zareie *et al.*, (2006) muestran que en modelos de estrés animal, el tratamiento con probiótico en ratas anuló completamente la adhesión bacteriana inducida por el estrés a la mucosa intestinal y la translocación de bacterias a ganglios linfáticos mesentéricos. Esa adhesión no es específica, por lo que intervienen factores físico-químicos o específicos en la superficie de las bacterias y moléculas receptoras adherentes sobre las células epiteliales (Salminen *et al.*, 1996).

El establecimiento de la microbiota intestinal está influenciado por muchos factores como el pH intestinal, la secreción de moco, el peristaltismo y el tiempo de tránsito a lo largo del tracto gastrointestinal (Hao y Lee, 2004; O'Sullivan *et al.*, 2005). Los estudios *in vitro* de Berthold-Pluta *et al.*, (2015) afirman que las células de *Bacillus sp.* se puede defender del estrés gastrointestinal y adherirse al epitelio. Sin embargo, la microbiota intestinal comensal posee actividad inhibidora contra ellos. Por lo anterior después de 8 días de exposición a estrés por calor, es probable que *B. subtilis* no hubiera logrado establecerse e incrementar su población de forma significativa en intestino, por lo que no se detectaron cambios en su población mediante la técnica empleada (Figura 6).

Los cuadros 7, 8 y 9 muestran los promedios del Ct de amplificación de ADN de los microorganismos intestinales analizados en los cerdos por día de muestreo y por grupo tratado. El Ct, del inglés *cycle threshold*, equivale al número

de ciclos necesarios para que cada curva de amplificación (en nuestro caso de cada género o especie bacteriana), alcance un umbral en la señal de fluorescencia. La importancia de este es, que la comparación de los Ct entre las muestras nos permite calcular la diferencia en la cantidad inicial de las moléculas del ADN específico que se desea evaluar, mientras mayor cantidad del ADN blanco haya en una muestra, menor el número de ciclos (Ct) que se requiere para alcanzar este umbral. Entonces, el Ct es un valor inversamente proporcional a la cantidad inicial del ADN blanco y a partir de este valor se pudo calcular la cantidad de ADN específico de cada especie en las muestras (Aguilera *et al.*, 2014).

**Cuadro 7.** Promedio del Ct de amplificación de ADN de microorganismos intestinales relativo a producto amplificado de bacterias totales (RNA ribosomal 16S) analizados en cerdos alimentados con la dieta testigo o con la suplementación de *B. subtilis* en los días 0, 2 y 8 de exposición al estrés por calor.

Bacteria	Tratamiento	Día			EE	Contrastes P <sup>a</sup> =			
		0	2	8		C1	C2	C3	C4
<i>E. coli</i>	Sin <i>B. subtilis</i>	8.18	7.01	7.37	1.07	0.288	0.461	0.050	0.006
	Con <i>B. subtilis</i>	9.01	6.77	5.68					
<i>Bacillus sp.</i>	Sin <i>B. subtilis</i>	1.33	1.16	1.88	1.38	0.907	0.694	0.621	0.766
	Con <i>B. subtilis</i>	1.58	0.89	2.00					
<i>Lactobacillus sp.</i>	Sin <i>B. subtilis</i>	5.92	4.58	6.46	0.92	0.164	0.566	0.364	0.747
	Con <i>B. subtilis</i>	5.85	4.99	5.55					
<i>Bifidobacterium sp.</i>	Sin <i>B. subtilis</i>	6.79	6.99	8.98	1.53	0.898	0.171	0.354	0.438
	Con <i>B. subtilis</i>	6.97	5.51	8.19					
<i>Clostridium sp.</i>	Sin <i>B. subtilis</i>	13.63	14.44	12.56	1.14	0.489	0.359	0.827	0.620
	Con <i>B. subtilis</i>	14.13	13.88	13.56					
<i>Shigella sp.</i>	Sin <i>B. subtilis</i>	n.d. <sup>b</sup>	n.d.	n.d.					
	Con <i>B. subtilis</i>	n.d.	n.d.	n.d.					
<i>Klebsiella sp.</i>	Sin <i>B. subtilis</i>	n.d.	n.d.	n.d.					
	Con <i>B. subtilis</i>	n.d.	n.d.	n.d.					

<sup>a</sup> Contrastes:  
 C1 : día 0 VS día 2 sin *B. subtilis*  
 C2: día 0 VS día 8 sin *B. subtilis*  
 C3: día 0 VS día 2 con *B. subtilis*  
 C4: día 0 VS día 8 con *B. subtilis*

<sup>b</sup>n.d. No detectado

**Cuadro 8.** Promedio del Ct de amplificación de ADN de microorganismos intestinales analizados en cerdos al día 0 (confort) y en los días 2 y 8 de exposición al estrés por calor.

Bacteria	Día				Contrastes P <sup>a</sup> =			
	0	2	8	EE	C1	C2	C3	C4
<i>E.coli</i>	8.60	6.89	6.53	0.75	0.009	0.035	0.012	0.639
<i>Bacillus sp.</i>	1.45	1.03	1.94	0.90	0.971	0.641	0.598	0.325
<i>Lactobacillus sp.</i>	5.88	4.78	6.00	0.62	0.374	0.092	0.851	0.064
<i>Bifidobacterium sp.</i>	6.88	6.25	8.59	1.04	0.557	0.55	0.115	0.035
<i>Clostridium sp.</i>	13.88	14.16	13.06	0.77	0.685	0.723	0.297	0.168

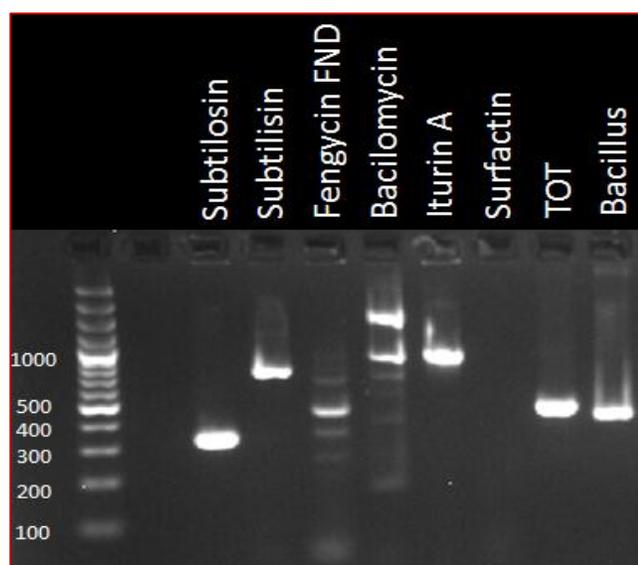
<sup>a</sup> Contrastes:  
 C1: día 0 VS día 2 y 8  
 C2: día 0 VS día 2  
 C3: día 0 VS día 8  
 C4: día 2 VS día 8

**Cuadro 9.** Promedio del Ct de amplificación de ADN de microorganismos intestinales analizados en cerdos alimentados con la dieta testigo o con la suplementación de *B. subtilis*.

Bacteria	Tratamiento	Media	EE	Valor de P
<i>E.coli</i>	Sin <i>B. subtilis</i>	7.524	0.504	0.613
	Con <i>B. subtilis</i>	7.158		
<i>Bacillus</i>	Sin <i>B. subtilis</i>	1.460	0.524	0.962
	Con <i>B. subtilis</i>	1.495		
<i>Lactobacillus</i>	Sin <i>B. subtilis</i>	5.653	0.388	0.734
	Con <i>B. subtilis</i>	5.465		
<i>Bifidobacterium</i>	Sin <i>B. subtilis</i>	7.590	0.649	0.456
	Con <i>B. subtilis</i>	6.894		
<i>Clostridium</i>	Sin <i>B. subtilis</i>	13.548	0.454	0.633
	Con <i>B. subtilis</i>	13.859		

El antagonismo bacteriano es un fenómeno común en la naturaleza; por lo tanto, las interacciones microbianas juegan un papel fundamental en el equilibrio entre microorganismos benéficos y potencialmente patógenos (Balcázar *et al.*, 2004). Ese equilibrio también puede afectarse por sustancias antimicrobianas que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. *B. subtilis* produce un amplio espectro de péptidos bioactivos con gran potencial para aplicaciones biotecnológicas y biofarmacéuticas tales como surfactina, subtilina, fengicina y los

compuestos de iturina y las bacillomicinas, que son antibióticos con potentes actividades antimicrobianas (Bland 1996; Fouad *et al.*, 2017). Se realizó una prueba de PCR para identificar la presencia de los genes para la síntesis de los antibióticos descritos anteriormente en el *B. subtilis* empleado en el presente experimento (Figura 7). De acuerdo con el tamaño del producto amplificado se identificó la presencia de los genes de Subtilosina (334pb), Subtilisina (704 pb) e Iturina A (885 pb), mientras que no se observó amplificación específica para Fengicina FND (293 pb), Bacilomicina (850 pb) y Surfactina (308 pb). Se puede especular que la presencia de estos antibióticos influyera en la población de otros microorganismos, y en que algunos como *E. coli* tuvieran mayor oportunidad de prevalecer en el intestino. Shelburne *et al.*, (2007) y Sutyak *et al.* (2008) menciona que subtilosina es altamente estable bajo tensiones de calor y pH y exhibe un efecto bactericida en una amplia gama de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, sin embargo se necesitan más estudios al respecto.



**Figura 7.** Fragmentos de ADN, amplificados por PCR punto final.

Los resultados de este trabajo también mostraron gran variación entre muestras, éste pudo ser otro aspecto a considerar a la hora de generar respuestas

---

que permitan establecer de manera más clara la interacción de *B. subtilis* y otras especies bacterianas que comprenden la microbiota intestinal del cerdo.

Los cambios ambientales y nutricionales pueden alterar drásticamente la población microbiana gastrointestinal (Burkholder *et al.*, 2008). Además, el tracto gastrointestinal es particularmente sensible a los factores estresantes, lo que puede causar una variedad de cambios incluyendo la alteración de la microbiota protectora normal (Lv *et al.*, 2015). Por lo tanto, la perturbación inducida por la elevada temperatura en la microbiota intestinal normal pudo no haber tenido el mismo efecto en todos los cerdos. Alejos *et al.* (2014) mencionaron que para realizar el ensayo de PCR en tiempo real es muy importante contar con ADN de buena calidad, en el presente trabajo algunos cerdos mostraron contenido intestinal muy viscoso, por lo que la extracción de ADN se dificultó y posiblemente estas muestras hayan influenciado en el resultado de abundancia en la presencia de las bacterias en estudio.

Hemos mencionado que el estrés por calor pone en peligro la salud humana y compromete la producción animal. Sin embargo, a pesar de los avances en la comprensión de las enfermedades relacionadas con el estrés por calor, aún no hay tratamiento contra aspectos específicos de su fisiopatología, y los protocolos se basan mayormente en mantener a los organismos en ambientes frescos y bien hidratados (Leon y Helwig, 2010). Por lo tanto, una mejor comprensión de las consecuencias biológicas del estrés por calor es un requisito previo para desarrollar estrategias de reducción de los efectos negativos y así prevenir la pérdida de eficiencia animal en épocas muy cálidas (Stowell *et al.*, 2009). Aunque no se observó incremento en la población de microorganismos benéficos después de la administración de *B. subtilis*, se sugiere continuar con la investigación al respecto debido a que no se descarta que este microorganismo por sí solo o en combinación con otros pudiera tener un efecto benéfico importante y proteger al intestino de los efectos del estrés por calor. Se proponen como posibles alternativas en la administración de *B. subtilis*, su uso en conjunto con aditivos

alimenticios como algunos ácidos, que tienen una actividad antibacteriana en el intestino y mejora el rendimiento productivo de los cerdos(Papatsiros *et al.*, 2011).

Considerando que en este primer experimento, la dosis usada no tuvo un cambio significativo en la mayoría de bacterias, tanto benéficas como patógenas, se plantea el aumento de la cantidad de *B. subtilis* a suministrar en animales en crecimiento en el siguiente experimento. Teniendo en cuenta que una dosis óptima podría producir efectos benéficos, pero que cantidades muy altas del microorganismo también pueden tener efectos negativos deteriorando la inmunidad de los cerdos (Wang *et al.*, 2011).

## VIII. EXPERIMENTO 2.

### **Efecto de la suplementación con *B. subtilis* en el comportamiento productivo, composición de la microbiota y estructura del epitelio intestinal de cerdos en estrés por calor**

#### **8.1 Objetivo**

Evaluar el efecto de *Bacillus subtilis*, aislado de intestino delgado de cerdos adaptados al EC, en el comportamiento productivo, estabilidad de la microbiota e integridad del epitelio intestinal de cerdos en crecimiento bajo condiciones de estrés por calor.

#### **8.2 Materiales y métodos**

El trabajo de campo de este experimento se llevó a cabo durante el verano de 2016 en la Unidad de Fisiología y Metabolismo de Cerdos, y los análisis de muestras en el Laboratorio de Nutrigenómica del ICA-UABC, en Mexicali, B.C., México.

Se emplearon 14 cerdos, seis hembras y ocho machos de raza cruzada de Landracex Yorkshire x Duroc, provenientes de la granja experimental porcina del ICA, con un peso vivo promedio inicial de  $25 \pm 2$  kg. Los cerdos fueron alojados dentro de una sala carente de aire acondicionado, por tanto la temperatura dentro de ésta reflejaba las variaciones diurnas de temperatura ambiental durante la etapa en que se realizó el experimento. Todos los cerdos fueron alimentados *ad libitum* con la misma dieta que para el experimento 1 (Cuadro 1); el agua potable también se ofreció a libre acceso.

El experimento tuvo una duración de 21 días y consistió en dos tratamientos con 7 réplicas (cerdos) cada uno. En el tratamiento uno (T1, grupo testigo) los cerdos fueron alimentados únicamente con la dieta experimental; en el tratamiento dos (T2), los cerdos recibieron el mismo alimento que en T1, pero adicionado con  $8.16 \times 10^{10}$  UFC de *B. subtilis* por día. El medio de cultivo de *B.*

---

*subtilis* administró diariamente con el alimento en dos raciones (0700 y 1900 h), 30 ml por ración, esparcido en el alimento, de forma similar a como se describe en el Experimento 1.

Los cerdos tuvieron un período de siete días antes del comienzo del experimento para adaptarse a la dieta y al manejo. Con la finalidad de analizar su comportamiento productivo, los cerdos fueron pesados semanalmente y se determinó su ganancia diaria de peso; además se registró el alimento ofrecido y rechazado para determinar las variables de consumo diario de alimento y conversión alimenticia.

Dentro de la sala en donde se alojó a los animales se colocó un higrotermógrafo (Thermotracker Higro) para registrar la temperatura ambiental y humedad relativa cada 15 minutos, así como para calcular el índice de calor dentro de la sala (Steadman, 1979; Rothfusz, 1990).

### **8.2.1 Colecta de muestras de contenido ileal**

Al final del experimento se sacrificaron cuatro cerdos por tratamiento en el taller de carnes de este instituto. Durante el sacrificio se colectaron muestras de contenido ileal de los cerdos en tubos cónicos de 50 ml. Una alícuota de 1 ml del material colectado fue empleada para la extracción de ADN genómico y mediante análisis de qPCR se determinó la variación en la población de *Bacillus sp*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp*, *Bifidobacterium sp.*, *Salmonella sp.*, *Clostridium perfringens*, *Shigella sp.*, y *Klebsiella sp.* en intestino delgado de los cerdos en estrés por calor que recibieron o no la suplementación con *B. subtilis*. La metodología empleada en este procedimiento fue la misma que se describió en el Experimento 1.

### **8.2.2 Colecta de muestras para análisis histológico de epitelio intestinal**

Una vez sacrificados los cerdos, se tomaron muestras de aproximadamente 10 cm de cada sección de intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), de las

cuales un fragmento se cortó longitudinalmente y otro transversalmente, y se depositaron en frascos de 50 ml con solución buffer de formaldehído al 10 %. La morfología del epitelio intestinal fue analizada empleando el método descrito por Moeser *et al.*, (2012). La estructura de la mucosa se observó en un microscopio BH2 Olympus (Olympus Tokio, Japan), empleando el objetivo de 10x. Se fotografiaron los campos en que se observaran las vellosidades bien orientadas y se midieron altura de vellosidades y profundidad de las criptas de al menos 10 vellosidades; empleando un sistema de análisis de imágenes (ImageJ) y expresada en micrómetros. Este procedimiento fue llevado a cabo por la M.C. Nydia Corina Vásquez Aguilar en el Laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### **8.2.3 Análisis estadístico**

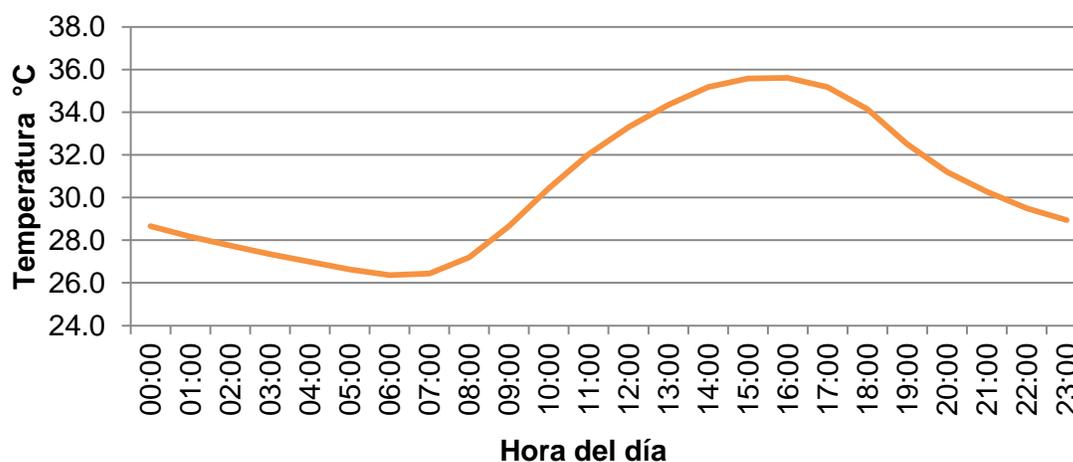
Los resultados obtenidos para las variables productivas, microbiota intestinal y características histológicas del epitelio intestinal se analizaron mediante análisis de varianza para un diseño de bloques completos al azar utilizando el programa Statistix 9.0. Las diferencias estadísticas se consideraron significativas cuando  $P < 0.05$ , y tendencias cuando  $0.05 < P < 0.10$ .

Los resultados de cuantificación de DNA se analizaron siguiendo la metodología de  $2^{-DDCt}$  descrita por Livak y Schmittgen (2001). De acuerdo con esos autores, los valores de Ct de cada muestra fueron corregidos con el Ct de los amplificados con el oligonucleótido de bacterias totales 16S para realizar el análisis estadístico.

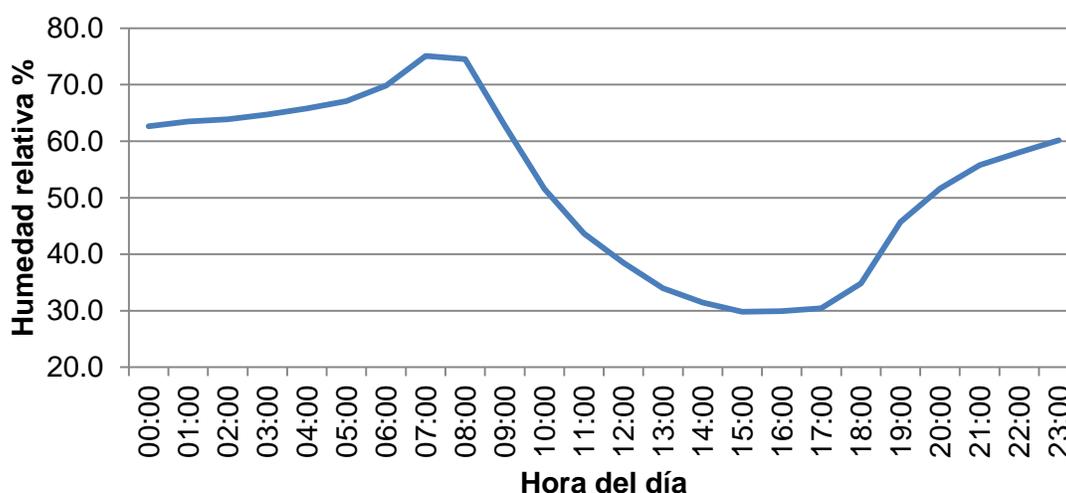
### **8.3 Resultados y discusión**

La temperatura ambiental en que se alojaron los animales fue en promedio 30.5 °C (Figura8), teniendo como máxima 35.6 °C y mínima 26.4 °C; con una humedad relativa promedio de 52.7%, máxima de 75.1% (Figura 9); el horario en que se presentó la mayor temperatura ambiental fue de las 1300 a 1800 horas y la mayor humedad relativa fue 0600 a 0800 horas. El índice de calor (Figura 10),

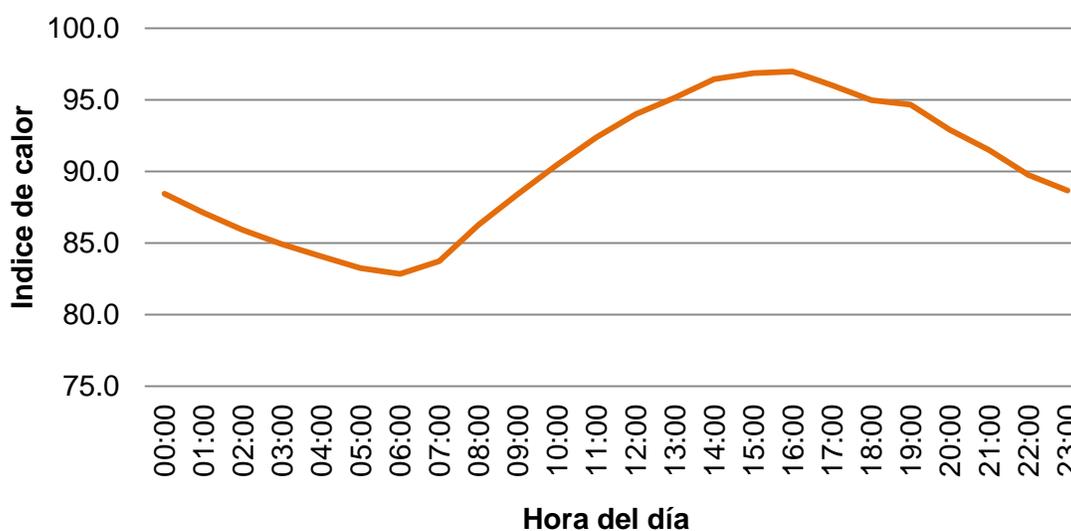
durante el periodo experimental tuvo un promedio de 90, se mantuvo por encima de este valor entre las 1000 y 2100 h, considerados como de cuidado extremo y peligroso (NOAA, 2017). Generalmente se ha encontrado un rango de temperatura ambiental de 18 a 22°C para tener un rendimiento productivo óptimo de cerdos de crecimiento-finalización (Huynh *et al.*, 2005; Quiniou *et al.*, 2001). Debido a que los cerdos tienen una capacidad limitada para perder calor por evaporación de agua de la piel (Ingram, 1965), cuando la temperatura ambientales más alta, el cerdo ya puede mostrar un aumento de la frecuencia respiratoria, temperatura rectal y disminución de la ingesta voluntaria de alimento (Quiniou *et al.*, 2000). Si la temperatura ambiental excede el punto por encima del cual se puede mantener el equilibrio entre la producción de calor y la pérdida de calor, la pérdida de calor por evaporación es máxima y la evaporación respiratoria será inadecuada e insuficiente para mantener la temperatura corporal constante (Huynh *et al.*, 2005). Bajo tales condiciones, los animales están por encima de la zona termoneutral. Por lo tanto las diferencias en las condiciones ambientales en donde fueron alojados los cerdos durante el experimento efectivamente demuestran que estuvieron en condiciones de estrés por calor, lo que podría modificar su fisiología y además, como lo menciona Huynh *et al.*, (2005) tales efectos serían más pronunciados cuando se une una humedad relativa elevada con temperatura ambiental alta.



**Figura 8.** Variación promedio de la temperatura ambiental a lo largo del día durante el periodo de estrés por calor.



**Figura 9.** Variación promedio de la Humedad relativa a lo largo del día durante el periodo de estrés por calor.



**Figura 10.** Variación promedio a lo largo del día en el índice de calor durante el período experimental.

Los resultados del comportamiento productivo se muestran en el Cuadro 10. No se observó efecto de la suplementación con *Bacillus subtilis* en la ganancia diaria de peso (GDP,  $P = 0.8714$ ), consumo diario de alimento (CDA,  $P = 0.7368$ ) y conversión alimenticia (CA,  $P = 0.5137$ ) de los cerdos durante el período completo de 21 días de exposición al estrés por calor. Cuando se analizó el efecto

de manera semanal tampoco se observó una mejora en la respuesta productiva de los cerdos.

**Cuadro 10.** Parámetros productivos de los cerdos en estrés por calor alimentados con una dieta testigo o suplementada con *B. subtilis* (GDP, ganancia diaria de peso; CDA, consumo diario de alimento; CA, conversión alimenticia).

	Grupo Testigo	Grupo Con <i>B. subtilis</i>	EE	Valor de <i>P</i>
<b>SEMANA 1</b>				
CDA	1.058	1.0682	0.0717	0.9217
GDP	0.7126	0.7914	0.0631	0.3945
CA	1.5642	1.3613	0.1341	0.3053
<b>SEMANA 2</b>				
CDA	1.2483	1.1535	0.0847	0.4430
GDP	0.711	0.6537	0.0525	0.4546
CA	1.765	1.7861	0.0775	0.8498
<b>SEMANA 3</b>				
CDA	1.2276	1.2201	0.1134	0.9630
GDP	0.6249	0.6432	0.0952	0.8939
CA	2.3568	2.0658	0.3385	0.5536
<b>GLOBAL</b>				
CDA	1.1777	1.1472	0.0627	0.7368
GDP	0.6826	0.6962	0.0582	0.8714
CA	1.751	1.6814	0.0734	0.5137

CDA= Consumo diario de alimento

GDP= Ganancia diaria de peso

CA= Conversión alimenticia

Resultados similares fueron reportados por Kritas y Morrison (2005), y Sheng *et al.*, (2015), quienes observaron que la suplementación con *Bacillus subtilis* con  $10^{12}$  UFC/0.45 kg de producto y  $1 \times 10^9$  UFC/g de alimento respectivamente, no presentó efectos significativos en el comportamiento productivo de cerdos en crecimiento. Sin embargo, se esperaba que la adición del bacilo provocara una mejora significativa en los parámetros productivos dado que existen diversos trabajos que lo reportan como los de Link y Kovac (2006) y Alexopoulos *et al.*, (2004) con  $3.2 \times 10^9$  UFC/g y  $1.28 \times 10^6$  esporas/g alimento respectivamente. Es importante hacer notar que a diferencia de los trabajos en

donde se presentan resultados importantes, esos se hicieron bajo condiciones ambientales distintas a las que ocurren en este experimento; en donde la temperatura ambiental en que se alojaron los animales fue elevada.

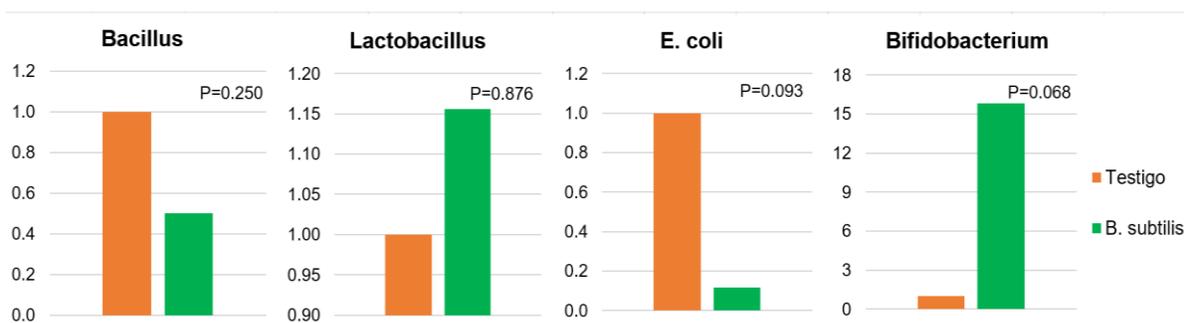
Collin *et al.*, (2001<sup>b</sup>) demostraron que el consumo voluntario de alimento se reduce por el aumento en la temperatura ambiente, esa reducción en el consumo es la principal responsable de la reducción en el rendimiento productivo de los cerdos. Debido que todos los animales en este experimento se encontraban en estrés por calor, el consumo de alimento fue similar en ambos grupos (suplementados o no con *B. subtilis*), como consecuencia tampoco se observó diferencia en la ganancia de peso ni conversión alimenticia.

No solo la temperatura ambiental elevada afecta el rendimiento productivo de los animales, se espera que los efectos del estrés por calor en los cerdos sean más pronunciados cuando la humedad relativa es más alta, como lo menciona Huynh *et al.* (2005). Con humedad relativa de hasta 75% durante el periodo experimental, se puede pensar que los cerdos tuvieron dificultades para disipar calor y mantener su temperatura corporal constante (Huynh *et al.* 2005).

Los resultados en parámetros productivos con la adición de *B. subtilis* no estuvieron en línea con las expectativas. Aunque hemos mencionado trabajos que muestran resultados a favor de la adición de *B. subtilis* en comportamiento productivo, otros estudios no lograron encontrar efectos positivos y sus discrepancias pueden ser atribuidas a infinidad de factores, tales como diferencias en la cepa administrada, variación en la dosificación del probiótico, estado de salud en los animales, higiene de la granja, edad de los cerdos, la composición de la dieta, forma de alimento, e interacciones con otros aditivos alimentarios (Lee *et al.*, 2014; y Lan *et al.*, 2016).

En la Figura 11 se presentan las modificaciones en la población de *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *E. coli* y *Bifidobacterium sp.* en intestino delgado de los cerdos en estrés por calor que recibieron la dieta suplementada con *B. subtilis* en

comparación con aquellos que recibieron la dieta testigo. No se observaron cambios en la población de *Bacillus* ni de *Lactobacillus* ( $P > 0.10$ ). Sin embargo, los cerdos que recibieron la suplementación con *B. subtilis* mostraron una tendencia a reducir a solamente el 12 % la población de *E. coli* original, en comparación a la población de este microorganismo observada en los cerdos que consumieron la dieta testigo ( $P = 0.093$ ). Además, la población de *Bifidobacterium* tendió a incrementar 15 veces ( $P = 0.068$ ) en los cerdos que recibieron la suplementación con *B. subtilis*, en comparación los que solamente recibieron la dieta testigo. Algunos autores han mencionado el efecto benéfico de suplementar cerdos con *B. subtilis*, sobre todo en lo que se refiere a que éste microorganismo pudiera favorecer el crecimiento de bacterias benéficas como *Bifidobacterium* y a controlar el crecimiento de otros microorganismos no deseables como *E. coli*, y *Salmonella* (Lee *et al.*, 2014).



**Figura 11.** Variaciones relativas en la microbiota intestinal de cerdos en EC alimentados con la dieta testigo o con suplementación de *B. subtilis*.

Aunque el mecanismo detallado a través del cual se observó una tendencia a la disminución de *E. coli* en el contenido ileal por administración de *B. subtilis* sigue siendo desconocido en este estudio. Algunas posibilidades se indican a partir de trabajos Guo *et al.* (2006), en donde informan que *B. subtilis* suprimió el crecimiento de las bacterias patógenas, incluyendo *Salmonella typhimurium*, *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, posiblemente a través de la producción de algunos metabolitos que inhiben patógenos como la bacteriocina y enzimas como la

subtilisina, producidos por *B. subtilis* (Cladera-Olivera *et al.*, 2004) y cuyo gen se detectó en la cepa de *B. subtilis* utilizada en este trabajo (Figura 7). De acuerdo con lo anterior, podríamos especular que se creó un ambiente positivo para que bacterias benéficas como *Bifidobacterium sp.*, colonizaran la mucosa intestinal y bloquearan los sitios de adhesión para patógenos, un mecanismo conocido como exclusión competitiva (Escalante, 2001). Por lo tanto, algunos agentes antibacterianos producidos por *B. subtilis* podrían estar asociados con la supresión de *E. coli* en el intestino.

**Cuadro 11.** Promedio del Ct de amplificación de ADN de microorganismos intestinales relativo a producto amplificado de bacterias totales (RNA ribosomal 16S) analizados en cerdos alimentados con la dieta testigo o con la suplementación de *B. subtilis* en condiciones de estrés por calor.

Bacteria	Tratamiento	Media	EE	Valor de P
<i>E.coli</i>	Sin <i>B. subtilis</i>	9.313	1.096	0.093
	Con <i>B. subtilis</i>	12.403		
<i>Bacillus</i>	Sin <i>B. subtilis</i>	0.965	0.557	0.250
	Con <i>B. subtilis</i>	1.967		
<i>Lactobacillus</i>	Sin <i>B. subtilis</i>	4.635	0.906	0.876
	Con <i>B. subtilis</i>	4.427		
<i>Bifidobacterium</i>	Sin <i>B. subtilis</i>	11.12	1.271	0.068
	Con <i>B. subtilis</i>	7.140		

Anteriormente se mencionó que la microbiota puede estar sujeta a numerosos cambios en el organismo, dentro de los cuales está el estrés por calor. Sin embargo, se necesitan más trabajos de investigación para tener una mejor comprensión de cómo se comporta la población intestinal en el animal bajo estas condiciones, y cómo sus funciones contribuyen a la salud y bienestar del huésped.

Hasta la fecha, hay poca información disponible acerca de la microbiota en el tracto gastrointestinal del cerdo (Isaacson y Kim, 2012), cuando se adicionan microorganismos funcionales como *B. subtilis*, por lo que indagarla causa o efecto vinculados a los cambios en los diferentes microorganismos, tendría una aplicación

directa en la producción animal y podría ser la base de nuevas prácticas de producción en cerdos.

En el Cuadro 12 se presentan los resultados de mediciones de altura de vellosidades intestinales y profundidad de criptas, así como la relación entre estos parámetros de los cerdos en estrés por calor que consumieron la dieta testigo y de los que fueron suplementados con *B. subtilis*, analizados en cortes histológicos. Se observó un incremento significativo en la altura de las vellosidades de duodeno e íleon ( $P \leq 0.002$ ) de los cerdos que recibieron la suplementación con *B. subtilis*, así como una mayor relación entre altura de vellosidades y profundidad de criptas en íleon de los cerdos suplementados con *B. subtilis* ( $P = 0.009$ ).

Se ha mencionado que en su necesidad de disipar calor, en los animales en estrés por calor se reduce el flujo sanguíneo al intestino a través de la reorientación de la sangre hacia la periferia lo que resulta en la privación local de oxígeno y energía en tracto gastrointestinal (Cronje, 2007). En estas circunstancias se pueden afectar las vellosidades intestinales y, en consecuencia reducirse la capacidad de absorción de nutrientes (Yu *et al.*, 2010).

Se ha observado que cuando los cerdos se someten a incremento repentino en la temperatura ambiental (respuesta de estrés por calor agudo), se presenta daño severo y pérdida de la integridad de la mucosa intestinal (Pearce *et al.*, 2013), lo que en consecuencia podría predisponerlos a infecciones y diarreas. Sin embargo, poco se conoce acerca de lo que ocurre en cerdos que son expuestos a incrementos naturales en la temperatura ambiente. Los cambios en la morfología del intestino delgado, en particular, el aumento de la altura de las vellosidades de los cerdos suplementados con *B. subtilis* en este experimento (Cuadro 12), pueden indicar una mejora en la salud intestinal y su capacidad de digestión y absorción. Lo anterior podría ser importante para contrarrestar y prevenir los efectos del estrés por calor en el epitelio intestinal (Zhang y Xu, 2003).

Los resultados de este trabajo son consistentes con los estudios de Ashraf *et al.*(2013) en aves y Moore *et al.*(2014) en ratas. Esos autores mencionan que el tratamiento con probióticos en animales en estrés por calor vitó el efecto traumático del calor en el intestino; posiblemente debido a que moléculas inductoras (quorum-sensing molecule) de *B. subtilis* promueven la síntesis de proteínas de choque térmico, que protegen a las células de epitelio intestinal contra lesiones y la pérdida de la función de barrera (Fujiya *et al.*, 2007).

**Cuadro 12.** Parámetros histológicos de vellosidades intestinales (micras), en las diferentes secciones y en promedio de intestino delgado de cerdos en EC alimentados con una dieta testigo o suplementados con *B. subtilis*

Variable	Sección	Sin <i>B. subtilis</i>	Con <i>B. subtilis</i>	Valor de <i>P</i>
Profundidad de cripta	Duodeno	175.27	187.74	0.166
	Yeyuno	169.71	180.51	0.340
	Ileón	142.31	142.86	0.949
	Promedio	162.43	170.38	0.1841
Altura de la vellosidad	Duodeno	387.38	435.72	0.002
	Yeyuno	418.00	433.60	0.340
	Ileón	339.89	393.71	0.001
	Promedio	381.71	420.91	0.0001
Relación altura:profundidad	Duodeno	2.290	2.370	0.486
	Yeyuno	2.580	2.560	0.925
	Ileón	2.490	2.860	0.009
	Promedio	2.4582	2.6018	0.0752
Ancho apical	Duodeno	59.19	54.55	0.236
	Yeyuno	69.76	74.90	0.728
	Ileón	50.83	54.04	0.409
	Promedio	59.933	61.165	0.8169
Ancho medio	Duodeno	91.32	87.65	0.555
	Yeyuno	91.78	92.26	0.955
	Ileón	79.93	83.91	0.464
	Promedio	87.682	87.91	0.9488
Ancho posterior	Duodeno	122.34	106.76	0.032
	Yeyuno	124.14	118.9	0.593
	Ileón	107.10	108.0	0.908
	Promedio	117.86	111.25	0.1828

Podemos especular que *Bacillus subtilis* puede proporcionar al cerdo la capacidad de mantener la integridad y homeostasis en la barrera intestinal por medio de la producción de sustancias antimicrobianas, formación de biopelícula y generación de enzimas como glucosil hidrolasas (Larsen *et al.*, 2014) producidas por este microorganismo, sin embargo este estudio es una etapa necesaria en la caracterización del uso de *B. subtilis* en vista de su aplicación como probiótico para la alimentación de cerdos, por lo que se necesitarían más estudios al respecto.

## IX. CONCLUSIONES

La temperatura intestinal de los cerdos en estrés por calor puede incrementarse hasta 1.5 °C. En esa condición la suplementación con  $2.16 \times 10^8$  UFC de *B. subtilis* no afectó la población de los microorganismos intestinales estudiados con respecto a la población observada en condición de confort, a excepción de *E. coli* que se incrementó en los días 2 y 8 de exposición al estrés por calor.

Aunque la suplementación con  $8.16 \times 10^{10}$  UFC de *B. subtilis* no mejoró los parámetros productivos de los cerdos en EC, sí ayudó a controlar el crecimiento de *E. coli*, considerada como una bacteria nociva en intestino delgado; al mismo tiempo que incrementó el crecimiento de *Bifidobacterium*, un microorganismo benéfico. Además, esta suplementación con *B. subtilis* mejoró las características histológicas del epitelio intestinal. Estos resultados sustentan la hipótesis de que suplementar con *B. subtilis* pudiera tener un efecto probiótico en cerdos en estrés por calor.

## XI. LITERATURA CITADA

- Aberle, E. D., R. A. Merkel, J. C. Forrest, and C. W. Alliston. (1974). Physiological responses of stress susceptible and Stress resistant pigs to heat stress. *J. Anim. Sci.* 38:950-959.
- Adair E.R., Black D.R., (2003). Thermoregulatory responses to RF energy absorption. *Bioelectromagnetics Suppl.* 6, S17–S38
- Afsharmanesh, M. y Sadaghi, B. 2014. Effects of dietary alternatives (probiotic, green tea powder and Kombucha tea) as antimicrobial growth promoters on growth, ileal nutrient digestibility, blood parameters, and immune response of broiler chickens. *Comparative Clinical Pathology*, 23(3): 717–724.
- Aguilera P., Ruiz M., Rocha M.G., Pineda B. y Chánez N.C. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. PCR en tiempo real. México.p. 175-201.
- Alejos L.P., Aragón M., Cornejo A. (2014). Extracción y purificación de ADN. México. p. 1-25
- Alexopoulos, C., Georgoulakis, I.E., Tzivara, A., Kyriakis, C.S., Govaris, A. and Kyriakis, S.C. (2004a) Field evaluation of the effect of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores on the health status, performance, and carcass quality of grower and finisher pigs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 51, 306–312.
- Alexopoulos, C., Georgoulakis, I.E., Tzivara, A., Kritas, S.K., Siochu, A., Kyriakis, S.C., (2004b). Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 88, 381–392.
- Anzures O., Macías C.U., Álvarez F.D., Correa C.A., Díaz M.R., Hernández J.A., Avendaño R.L. (2015). Efecto de época del año (verano vs. invierno) en variables fisiológicas, producción de leche y capacidad antioxidante de vacas Holstein en una zona árida del noroeste de México. *Arch Med Vet* 47, 15-20
- Arce N, Castillo G, Cota M, García H, Araiza BA, Cervantes M, Morales A. (2014). El estrés por calor severo afecta la respuesta inmune de cerdos destetados desafiados con lipolisacarido de *Escherichia coli*. *Memorias de la XXIV*

Reunión Internacional sobre Producción de Carne y Leche en Climas Cálidos. Mazatlán Sin., p. 755-759.

- Arce N., Cota M., Morales A., Araiza B., Cervantes M. (2013). Heat stress affects the intestinal temperature in growing pigs. *Memorias de ASAS Joint Annual Meeting*. Indianapolis IN, 8 al 12 de julio de 2013.
- Ashraf S., Zaneb H., Yousaf M.S., Ijaz A., Sohail M.U., Muti S., Usman M.M., Ijaz S. y Rehman H. (2013). Effect of dietary supplementation of prebiotics and probiotics on intestinal microarchitecture in broilers reared under cyclic heat stress. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97:68–73
- Bach K.K.E. (2001). Development of antibiotic resistance and options to replace antimicrobials in animal diets. *Proceeding of the Nutrition Society*, 60: 291-299.
- Baker A.A., Davis E., Spencer J.D., Moser R., y Rehberger T. (2013). The effect of a *Bacillus*-based direct-fed microbial supplemented to sows on the gastrointestinal microbiota of their neonatal piglets. *J. Anim. Sci.* 91:3390–3399
- Balcázar J.L., de Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Vendrell D., Muzquiz J.L. (2004). Probiotics: a tool for the future of fish and shellfish health management. *Journal of Aquaculture in the Tropics* 19, 239–242.
- Barbosa, T.M., Serra, C.R., La Ragione, R.M., Woodward, M.J., Henriques, A.O., 2005. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 968-978.
- Baumgard L.H., Rhoads R.P., Rhoads M.L., Gabler N.K., Ross J.W., et al. (2012). Impact of climate change on livestock production. In *Environmental Stress and Amelioration in Livestock Production*, ed. V Sejian, SMK Naqvi, T Ezeji, J Lakritz, R Lal, pp. 413–468. New York: Springer.
- Baumgard L. y Rhoads R.P. Jr. (2013). Effects of Heat Stress on Postabsorptive Metabolism and Energetics. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2013. 1:311–337.
- Berg A., Muller H.M., Rathmann S. y Deibert P. (1999). The gastrointestinal system - An essential target organ of the athlete's health and physical performance. *Exerc Immunol Rev* 5, 78–95.
- Berthold-Pluta, A., Pluta, A., y Garbowska, M. (2015). The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract. *Microb. Pathog.* 82, 7–14. doi: 10.1016/j.micpath.2015.03.015
- Bland JM. (1996). The first synthesis of a member of the iturin family, the antifungal cyclic lipopeptide, iturin-A2. *J. Org. Chem.* 61: 5663–5664.

- Bortolozzo, F. y Kira, K. (2002). Probióticos. Uso de los probióticos na alimentacio de frangos de corte. File://A:/ probióticos 10. Htm.pp:1
- Brisse S, Verhoef J. 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:915–924.
- Bunglavan S.J., Y Chaturvedi V.B. (2013) Heat stress: impact on animal production and nutritional strategies for mitigation of heat stress in dairy cattle. Livestock line. 46-49.
- Burkholder, K.M.; Thompson, K.L.; Einstein, M.E.; Applegate, T.J.; Patterson, J.A., (2008). Influence of stressorson normal intestinal microbiota,intestinal morphology, and susceptibilyto salmonella enteritidis colonizationin broilers. Poultry Science 87,1734–1741.
- Butaye P., Devriese L.A. y Haesebrouck F. (2003). Antimicrobial growth promoters used in animals feed: Effects of less well known antibiotics on gram positive baceteria. Clin Microbiol. Rev. 16: 175-188.
- Cao Y., Xu Z., Ling N, Yuan Y., Yang X., Chen L., Shen B., Shen Q. (2012). Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 forsuppressing *Fusarium* wilt of cucumber. Scientia Horticulturae 135: 32–39
- Cho JH, Zhao PY, Kim IH. 2011. Probiotics as a Dietary Additive for Pigs: A Review. Journal of Animal and Veterinary Advances. 10 (16):2127-2134.
- Christison, G.I., Johnson, H.D., 1972. Cortisol turnover in heat-stressed cows. J. Anim. Sci. 35, 1005–1010.
- Cladera-Olivera F, Caron GR, Brandelli A (2004) Bacteriocinlikesubstance production by *Bacillus licheniformis* strainP40. Lett Appl Microbiol 38:251–256
- Close W.H., Mount L.E. y Start I.B. (1971). The influence of environmental temperature and plane of nutrition on heat losses from groups of growing pigs. Anim. Prod. 13:285–94.
- Collier, R. J., J. L. Collier, R. P. Rhoads, and L. H. Baumgard. 2008. Genes involved in the bovine heat stress response. J. Dairy Sci. 91:445–454.
- Collier, R.J., Beede, D.K., Thatcher, W.W., Israel, L.A., Wilcox, C.J., 1982. Influences of environment and its modification on dairy animal health and production. J. Dairy Sci. 65, 2213–2227.

- Collin A., Van Milgen J., Dubois S., Noblet J. (2001). Effect of high temperature and feeding level on energy utilization in piglets. *J. Anim. Sci.* 79:1849–57.
- Collin A., Van Milgen J. y Dividich J.L. (2001 b). Modelling the effect of high, constant temperature on food intake in young growing pigs. *Animal Science*, 72:519-527
- Crandall, C.G. y Gonzalez-Alonso, J. (2010) Cardiovascular function in the heat-stressed human. *Acta Physiol* 199, 407–423.
- Cronje, P. B., 2007: Gut health, osmoregulation and resilience to heat stress in poultry. *Australian Poultry Science Symposium* 9-13.
- Cui C., Shen C.J., Jia G. y Wang K.N. (2013). Effect of dietary *Bacillus subtilis* on proportion of Bacteroidetes and Firmicutes in swine intestine and lipid metabolism. *Genetics and Molecular Research* 12 (2): 1766-1776
- Cutting S.M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology* 28: 214-220
- David, N.K., Anthony, J.M. y Robert, E.F. (1990). Effect of stress on the immune system. *Immunology today*. 11: 170-175.
- Deng, J., Li Y., Zhang, J., Yang Q. (2013) Co-administration of *Bacillus subtilis* RJGP16 and *Lactobacillus salivarius* B1 strongly enhances the intestinal mucosal immunity of piglets. *Research in Veterinary Science* 94: 62–68
- Diario Oficial de la Federación. 28 de abril de 2014, Segunda Sección Vespertina p. 8-10.
- Dobson, H. y Smith, R.F. (2000). What is stress and how does it affect reproduction. *Animal Reproduction Science*, 60: 743-752.
- Dowarah R., Verma A.K., Neeta A. (2017) The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review. *Animal Nutrition* 3 1-6.
- Escalante A. (2001) El potencial de manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. *Enferm Infecc Microbiol.* 21:106-114.
- Espinosa F.J.J. (2005). Caracterización del proceso de crecimiento de *Bacillus subtilis* bajo condiciones anaerobias. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organisation) 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert

- Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 1–4 October 2001, Cordoba, Argentina, pp. 1–33.
- FAO/WHO Joint FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) (2002). working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. 1- 11.
- Fouad M.F., Namita R., Rohini D.G., Chetan S. y Harsh P. (2017). Bacillus As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Front. Microbiol.* 8:1490
- Fu, C.J., Carter, J.N., Li, Y., Proter, J.H. and Kerley, M.S. (2006) Comparison of agar plate and real-time PCR on enumeration of *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* and total anaerobic bacteria in dog faeces. *Lett Appl Microbiol* 42, 490–494.
- Fujiya M., Musch M.W., Nakagawa Y., Hu S., Alverdy J., Kohgo Y., Schneewind O., Jabri B. et al. (2007). The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. *Cell Host Microbe* 1, 299–308.
- Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365–378.
- Gaggia F., Mattarelli P., Biavati B. (2010) Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology* 141 S15–S28
- Ganaie A.H. (2012). Immunological and biochemical changes during thermal stress in buffaloes supplemented with vitamin C. 21. Tesis de Maestría. Deemed University. Haryana, India.
- Ghosh, S.; Sinha, A.; Sahu, C., 2008: Dietary probiotics supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. *Aquaculture Nutrition* 14, 289–299.
- Giannenas, I., Papadopoulos, E., Tsalie, E., Triantafillou, E., Henikl, S., Teichmann, K. & Tontis, D. 2012. Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance, intestinal morphology and microflora of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology*, 188(1/2): 31–40.
- Gruenwald J., Graubaum H.J. y Harde A. (2002). Effect of a probiotic multivitamin compound on stress and exhaustion. *Adv Ther* 19, 141–150.

- 
- Guarner F. y Malagelada J.R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet* 361, 512–519.
- Guillot, J.F. (2000). The pros and cons of probiotics. Make probiotics work for poultry. *World Poultry* 16:18
- Han GQ, Xiang ZT, Yu B, Chen DW, Qi HW, Mao XB, Chen H, Mao Q, Huang ZQ. 2012. Effects of different starch sources on *Bacillus* spp. in intestinal tract and expression of intestinal development related genes of weanling piglets. *Mol Biol Rep.* 2012 Feb;39(2):1869-76.
- Hao W.L., Lee Y.K. (2004). Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods in Molecular Biology* 268, 491–502.
- Hartl D.L., Dykhuizen D.E., (1984). The Population Genetics of *Escherichia Coli*. *Annual Review of Genetics* 18, 31–68.
- Heo J.M., Opapeju F.O., Pluske J.R., Kim J.C., Hampson D.J. y Nyachoti C.M. (2013). Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97: 207–237.
- Hermans, P. y Morgan, K. 2007. Prevalence and associated risk factors of necrotic enteritis on broiler farms in the United Kingdom; a cross-sectional survey. *Avian Pathology*, 36(1): 43–51.
- Hong JW, Kim IH, Kwon OS, Kim JH, Min BJ, Lee WB. (2002). Effect of dietary probiotic supplementation on growth performance and fecal gas emission in nursing and finishing pigs. *J Anim Sci Technol (Korea)* 44:305-14.
- Hooper, L.V. y Gordon, J.I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292:1115-1118.
- Hooper, L.V. (2004). Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol.* 12:129-134.
- Horowitz, M., L. Eli-Berchoer, I. Wapinski, N. Friedman, and E. Kodesh. 2004. Stress-related genomic responses during the course of heat acclimation and its association with ischemic-reperfusion cross-tolerance. *J Appl Physiol* 97: 1496–1507.

- Hou C, Zeng X, Yang F, Liu H, Qiao S. (2015) Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review. *J Anim Sci Biotechnol.* 6:14-9.
- Huang CH, Qiao SY, Li DF, Piao XS, Ren JP. (2004). Effects of Lactobacilli on the performance diarrhea incidence VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs. *Asian Aust J Anim Sci.*17:401-9.
- Huynh, T.T.T., A.J.A. Aarnink, M. W. A. Verstegen, W. J. J. Gerrits, M. J. W. Heetkamp, B. Kemps, and T. T. Canh. 2005. Effects of increasing temperatures on physiological changes in pigs at different relative humidities. *J. Anim. Sci.* 83:1385–1396.
- Ingram, D. L. 1965. Evaporative Cooling in Pig. *Nature* 207:415–416.
- Isaacson R. y Kim B.H. (2012). The intestinal microbiome of the pig. *Animal Health Research Reviews* 13(1); 100–109
- Jacela JY, DeRouchey JM, Tokach MD, et al. (2010). Feed additives for swine: Fact sheets – prebiotics and probiotics, and phyto-genics. *J Swine Health Prod.* 18(3):132–136.
- Jayaraman, S., Thangavel, G., Kurian, H., Mani, R., Mukkalil, R. & Chirakkal, H. 2013. *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Poultry Science*, 92(2): 370–374.
- Jensen B.B. (1998). The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences.* 7, 45–64.
- Jensen A.R., Elnif J., Burrin D.G., Sangild P.T., (2001). Development of intestinal immunoglobulin absorption and enzyme activities in neonatal pigs is diet dependent. *Journal of Nutrition* 131, 3259–3265.
- Jensen, G.B., Hansen, B.M., Eilenberg, J. and Mahillon, J. (2003) The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ Microbiol* 5, 631–640.
- Joshi, R., Gardener, B.B.M., 2006. Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*96, 145–154.
- Kaufman P., Pfeffernkorn A., Teuber M., Meile L. 1997. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-

- specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1268-1273.
- Kelly, D., King, T. y Aminov, R. (2007). Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat. Res.* 622:58-69.
- Kenny M, Smidt H, Mengheri E, Miller B. 2011. Probiotics - do they have a role in the pig industry? *Animal* 5(3):462-470.
- Keysami, M. A.; Saad, C. R.; Sijam, K.; Daud, H. M.; Alimon, A. R., 2007: Effect of *Bacillus subtilis* on growth development and survival of postlarvae *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Nutrition* 13, 131–136.
- Kimothi, S.P. y Ghosh C.P., (2005). Strategies for ameliorating heat stress in dairy animals. *Dairy Year book.* 371-377.
- Kong R.Y.C, Lee S.K.Y, Law T.W.F, Law S.H.W, Wu R.S.S. (2002). Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Res.* 36:2802–2812
- Kong X.F., Yin F.G y He Q.H. (2009). *Acanthopanax senticosus* extract as a dietary additive enhances the apparent ileal digestibility of amino acid in weaned piglets. *Livestock Science*, 123: 261-267.
- Kritas, S.K. and Morrison, R.B. (2005) Evaluation of probiotics as a substitute for antibiotics in a large pig nursery. *Vet Rec* 156, 447–448.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 388:621–625.
- Kumar S, Verma AK, Singh P. (2012) Effect of live *Saccharomyces cerevisiae* on immune response in early weaned crossbred piglets. *Indian J Anim Nutr* 29(4): 393-6.
- Kurtoglu, V., Kurtoglu, F., Seker, E., Coskun, B., Balevi, T. & Polat, E. 2004. Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol. *Food Additives and Contamination*, 21(9): 817–823.
- Lacetera N, Bernabucci U, Scalia D, Basiricò L, Morera P, Nardone A. 2006. Heat stress elicits different responses in peripheral blood mononuclear cells from Brown Swiss and Holstein cows. *J Dairy Sci.* 89(12):4606-12.

- 
- Lambert, G. P. 2009. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. *J. Anim. Sci.* 87:E101–E108.
- Lan R., Tran H., Y Kim I. (2016). Effects of probiotics supplementation in different nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, fecal microflora and noxious gas emission in weaning pigs. *Department of Animal Resource & Science, Dankook University, Cheonan, Chungnam 330-714, South Korea.* doi: 10.1002/jsfa.7871
- Larsen N., Thorsen L., Nayra K.E., Stuer-Lauridsen B., Dines C.M., Nielsen B., Brockmann E., Patrick M.F. y Jespersen L. (2014). Characterization of *Bacillus* spp. strains for use as probiotic additives in pig feed. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:1105–1118
- Leon L.R. y Helwig B.G. (2010). Heat stroke: role of the systemic inflammatory response. *J. Appl. Physiol.* 109:1980–1988.
- Le Bellego, L., J. van Milgen, and J. Noblet. 2002. Effect of high temperature and low-protein diets on the performance of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 80:691–701.
- Le Dividich, J., Noblet, J., Herpin, P., van Milgen, J., Quiniou, N., 1998. Thermoregulation. In: Wiseman, J., Varley, M.A., Chadwick, J.P. (Eds.), *Proc. of the 58th Easter School in Agricultural Science, Progress in Pig Science*, Nottingham University Press, pp. 229–264.
- Lee DH, Bae JE, Lee JH, Shin JS, Kim IS. 2010. Quantitative detection of residual *E. coli* host cell DNA by real-time PCR. *J Microbiol Biotechnol.* 20(10):1463-70.
- Lee JHVD, Valeriano YR, Shin JP, Chae GB, Kim JS, Ham J, et al. (2012). Genome sequence of *Lactobacillus mucosae* LM1 isolated from piglet feces. *J Bacteriol* 194: 47-66.
- Leser T.D., Knarreborg A. y Worm J. (2008) Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. *Journal of Applied Microbiology* 104: 1025–1033
- Link, R. y Kovac, G. (2006) The effect of probiotic BioPlus 2B on feed efficiency and metabolic parameters in swine. *Biologia, Bratislava* 61, 783–787.

- Liu, F., Yin, J., Du, M., Yan, P., Xu, J., Zhu, X., Yu, J., 2009. Heat-stress-induced damage to porcine small intestinal epithelium associated with downregulation of epithelial growth factor signaling. *J. Anim. Sci.* 87, 1941–1949.
- Liu, K. F.; Chiu, C. H.; Shiu, Y. L.; Cheng, W.; Liu, C. H., 2010: Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and Shellfish Immunology* 28, 837–844.
- Lv C.H., Wang T., Regmi N., Chen X., Huang K. y Liao S.F. (2015). Effects of dietary supplementation of selenium-enriched probiotics on production performance and intestinal microbiota of weanling piglets raised under high ambient temperature. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 99 1161–1171.
- McDevitt, R., Brooker, J., Acamovic, T. & Sparks, N. 2006. Necrotic enteritis; a continuing challenge for the poultry industry. *World Poultry Science Journal*, 62(02): 221–247
- Méndez T.V., Avelar L.E., Morales T.A., Cervantes R.M., Araiza P.A., González M.D. 2011. A rapid protocol for purification of total RNA for tissues collected from pigs at a slaughterhouse. *Genetics and Molecular Research.* 10 (4): 3251-3255.
- Metchnikoff E. (1912) Prolongation of Life. American Journal of Public Health (New York, N.Y.
- Mikkelsen P.B., Toubro S., Astrup A. (2000). Effect of fat-reduced diets on 24-h energy expenditure: comparisons between animal protein, vegetable protein, and carbohydrate. *American Journal of Clinical Nutrition* 72, 1135-1141.
- Milián G., Pérez M. y Bocourt R. (2008) Empleo de probióticos basado en *Bacillus sp* y de sus endosporas en la producción avícola. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 42, Número 2.
- Mohapatra S., Chakraborty T., Kumar V., DeBoeck G. y Mohanta K.N. (2013). Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97: 405–430

- Moore T., Globa L., Pustovyy O., Vodyanoy V. y Sorokulova I. (2014). Oral administration of *Bacillus subtilis* strain BSB3 can prevent heat stress-related adverse effects in rats. *Journal of Applied Microbiology*. 117, 1463-1471
- Morales A, Cota M, Arce N, Castillo G, Cervantes M, Araiza A. Effect of heat stress on body temperature, respiratory frequency and performance of pigs. FASEB Experimental Biology 2013. Boston MA. USA. 2013.
- Morales A, Grageola F, García H, Arce N, Araiza B, Yáñez J, Cervantes M. (2014). Performance, serum amino acid concentrations and expression of selected genes in pair-fed growing pigs exposed to high ambient temperatures. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 98:928-935.
- Morales A., Ibarra N., Chávez M., Gómez T., Suárez A., Valle J.A., Camacho R.L., y Cervantes M. (2017). Effect of feed intake level and dietary protein content on the body temperature of pigs housed under thermo neutral conditions. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*
- Morrow-Tesch JL, McGlone JJ, Salak-Johnson JL (1994). Heat and social stress effects on pig immune measures. *J Anim Sci*. 72(10):2599-609.
- Moseley P.L. y Gisolfi, C.V. (1993) New frontiers in thermoregulation and exercise. *Sports Med* 16, 163–167.
- Nadkarni, M.A., Martin, F.E., Jacques, N.A., and Hunter, N. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad range (universal) probe and primers set. *Microbiol-SGM*. 148, 257–266.
- Nakamura LK, MS Roberts, FM Cohan (1999). Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. Nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 49: 1211-1215.
- Neu J., Douglas-Escobar M. y Lopez M. (2007). Microbes and the developing gastrointestinal tract. *Nutr. Clin. Pract*. 22:174-182.
- NOAA / National Weather Service. (2017). National Centers for Environmental Prediction Weather. [http://www.nws.noaa.gov/os/heat/heat\\_index.shtml](http://www.nws.noaa.gov/os/heat/heat_index.shtml)
- Ohashi Y. y Ushida U (2009). Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Animal Science Journal*,80: 361-371.

- 
- O'Sullivan G.C., Kelly P., O'Halloran S., Collins C., Collins J.K., Dunne C., Shanahan F. (2005). Probiotics: an emerging therapy. *Current Pharmaceutical Design* 11, 3–10.
- Parker R.B. (1974) Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health* 29 4 8.
- Patil A.K., Sachin K., Verma A.K. y Baghel R.P. (2015). Probiotics as Feed Additives in Weaned Pigs: A Review. *Livestock Research International*. 3 2 31-39
- Papatsiros V.G., Tassis P.D., Tzika E.D., Papaioannou D.S., Petridou E., Alexopoulos C., Kyriakis S.C. (2011). Effect of benzoic acid and combination of benzoic acid with a probiotic containing *Bacillus Cereus var. toyoi* in weaned pig nutrition. *Polish Journal of Veterinary Sciences* Vol. 14, No. 1, 117-125
- Pearce SC, Mani V, Boddicker RL, Johnson JS, Weber TE. (2013). Heat stress reduces intestinal barrier integrity and favors intestinal glucose transport in growing pigs. *PLoS ONE* 8(8): e70215.
- Pearce, V. Mani, T. E. Weber, R. P. Rhoads, J. F. Patience, L. H. Baumgard and N. K (2013), Heat stress and reduced plane of nutrition decreases intestinal integrity and function in pigs. *J. Anim. Sci.* 91(11):5183-93.
- Pérez M., Hernández L., Buenabad L., Castillo G., Morales A., Cervantes M. 2014. Temperatura subcutánea e intestinal en cerdos bajo condiciones de estrés por calor severo. *Memorias de la XXIV Reunión Internacional sobre Producción de Carne y Leche en Climas Cálidos. Mazatlán Sin.*, p. 737-742.
- Pluske J.R., Pethick D.W., Hopwood D.E., Hampson D.J. (2002). Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pigs. *Nutrition Research Reviews* 15, 333–371.
- Prosser C., Stelwagen K., Cummins R., Guerin P., Gill N., Milne C. (2004). Reduction in heat-induced gastrointestinal hyperpermeability in rats by bovine colostrums and goat milk powders. *Journal of Applied Physiology* 96, 650–654.

- Quiniou, N., S. Dubois, and J. Noblet. (2000). Voluntary feed intake and feeding behaviour of group-housed growing pigs are affected by ambient temperature and body weight. *Livestock Production Science* 63:245–253
- Quiniou, N., Noblet J., van Milgen J., Dubois S. (2001). Modeling heat production and energy balance in group-housed growing pigs exposed to low or high ambient temperatures. *Br. J. Nutr.*85:97–106.
- Rahn, K., De Grandis, S. A., Clarke, R. C., Mcewen, S. A., Galán, J. E., Ginocchio, C., Curtiss, R. & Gyles, C. L. 1992. Amplification of An Inva Gene Sequence of Salmonella Typhimurium by Polymerase Chain Reaction As A Specific Method of Detection of Salmonella. *Molecular And Cellular Probes*, 6, 271-279.
- Ramendra D., Lalrengpuii S., Nishant V., Pranay B., Jnyanashree S., y Rakesh K. (2016) Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Veterinary World*, 9(3): 260-268.
- Resta SC. 2009. Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling. *Journal of Physiology* 587, 4169–4174.
- Rhoads, M.L., R. P. Rhoads, M. J. VanBaale, R. J. Collier, S. R. Sanders, W. J. Weber, B. A. Crooker, and L. H. Baumgard. 2009. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *J. Dairy Sci.* 92:1986–1997.
- Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogus L, Palva A. 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol.* 97(6):1166-77.
- Rothfusz, L., 1990. The Heat Index "Equation" (or, More than you ever wanted to know about Heat Index). Scientific Services Division NWS Southern Region Headquarters. Technical Attachment. Fort Worth, TX.
- Sachan N., Singh V.P., (2010). Effect of climatic changes on the prevalence of zoonotic diseases. *Veterinary World*. Vol.3 (11):519-522
- Salminen S., Isolauri E., Salminen, E. (1996). Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains for future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 347–358.

- Schierack P., Steinruck H., Kleta S., Vahjen W. (2006). Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* Isolates from clinically healthy pigs. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 6680–6686.
- Sharma, G.T., Majumdar, A.C. y Gupta, L.K. (1999). In vitro studies in the release of intracellular prolactin from lymphocytes using stress related amines and hormones. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*.12(7):1031-1034.
- Shelburne CE, An FY, Dholpe V, Ramamoorthy A, Lopatin DE, Lantz MS. (2007). The spectrum of antimicrobial activity of the 18 bacteriocin subtilosin A. *J Antimicrob Chemo*. 59:297–300.
- Sheng Q.K., Zhou K.F., Hu H.M., Zhao H.B., Zhang Y., y Ying W. (2015). Effect of *Bacillus subtilis* Natto on Meat Quality and Skatole Content in TOPIGS Pigs. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* [Epub ahead of print] <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.15.0478>
- Sissons J.W. (1989). Potential of Probiotic Organisms to Prevent Diarrhoea and Promote Digestion in Farm Animals-A Review. *J Sci Food Agric*. 49, 1-13
- Slimen B.I., Najar T., Ghram A. y Abdrrabba M. (2016). Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 100: 401–412.
- Smith D.L, Harris A.D. y Johnson JA (2002). Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human comensal bacteria. *Proceedings of National Academy of Sciences (USA)*, 99: 6434-6439.
- Soleimani A.F., Kasim A., Alimon A.R., Meimandipour A. y Zulkifli I. (2010). Ileal endogenous amino acid flow of broiler chickens under high ambient temperatura. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. (94) 641–647.
- Spinosa, M.R., Braccini, T., Ricca, E., De Felice, M., Morelli, L., Pozzi, G., Oggioni, M.R., 2000. On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Res. Microbiol*. 151, 361-368
- Steadman, R.G.,1979.The assessment of sultriness. Part I: A temperature-humidity index based on human physiology and clothing science. *J. Appl. Meteor* 18, 861–873.

- Stein, H. H., B. Sève, M. F. Fuller, P. J. Moughan, and C. F. M. de Lange. (2007). Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application. *J. Anim. Sci.* 85:172–180. doi:10.2527/jas.2005-742
- Stowell R.T., Mader y Gaughan J.(2009). Environmental Management. in *Livestock energetics and thermal environmental management*. St Joshep, MI: Am Soc Agric Biol Eng, pp. 181–209.
- St-Pierre N. R., Cobanov B., y Schnitkey G., (2003). Economic Losses from Heat Stress by US Livestock Industries. *J. Dairy Sci.* 86:(E. Suppl.):E52–E77
- Sutyak KE, Wirawan RE, Aroutcheva AA, Chikindas ML. (2008). Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Appl Microbiol.*104:1067–1074.
- Tam, N.K.M., Uyen, N.Q., Hong, H.A., Duc Le, H., Hoa, T.T., Serra, C.R., Henriques, A.O. and Cutting, S.M. (2006) The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J Bacteriol* 188, 2692–2700.
- Varedi M., Chinery R., Greeley G.H., Herndon D.N., Englander E.W. (2001). Thermal injury effects on intestinal crypt cell proliferation and death are cell position dependent. *American Journal of Physiology.* 280G, 157–163.
- Verdenelli M.C., Ghelfi F. y Silvi S. (2009). Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *European Journal of Nutrition*, 48: 355-363.
- Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 655–671.
- Vu-Khac H., Holoda E., Pilipcinec E., Blanco M., Blanco J.E., Dahbi G., Mora A., Lopez C., Gonzalez E.A., Blanco J. (2007). Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. *Veterinary Journal* 174, 176–187.
- Wang J, Ji HF, Wang SX, Zhang DY, Liu H, Shan DC, et al. (2012). *Lactobacillus plantarum*ZLP001: In vitro assessment of antioxidant capacity and effect on growth performance and antioxidant status in weaning piglets. *Asian Australas J Anim Sci* 25(8):1153-8.

- Wang S.P., Yang L., Tang X.S., Cai L.C., Liu G., Kong X.F., Blachier F. y Yin Y.L. (2011). Dietary supplementation with high-dose *Bacillus subtilis* or *Lactobacillus reuteri* modulates cellular and humoral immunities and improves performance in weaned piglets. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, Vol.9 (2)
- Weichselbaum E. (2009). Probiotics and health: a review of the evidence. *Nutrition Bulletins*, 34: 340-373.
- Wilson KH, Blitchington RB, Greene RC. (1990). Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 28(9): 1942–1946.
- Yin Q., Zheng Q. (2005). Isolation and identification of the dominant lactobacillus in gut and faeces of pigs using carbohydrate fermentation and 16S rDNA analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99, 68–71.
- Yu J, Yin P, Liu F, Cheng G, Guo K, Lu A, Zhu X, Luan W, Xu J. (2010). Effect of heat stress on the porcine small intestine: A morphological and gene expression study. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 156 119–128.
- Zareie M., Johnson-Henry K., Jury J., Yang P.C., Ngan B.Y., McKay D.M., Soderholm J.D., Perdue M.H. et al. (2006) Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut* 55, 1553–1560.
- Zhang Y., Xu R.J., (2003). Anatomy and histology of the gastrointestinal tract. In: R. J. Xu, P. D. Cranwell (eds), *The Neonatal Pig: Gastrointestinal Physiology and Nutrition*. Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham, UK, pp. 1.
- Zhang W.P., Zhao M.J., Ruesch L., Omot A., Francis D., (2007). Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Veterinary Microbiology* 123, 145–152.

## X. ANEXOS

La dosis de *B. subtilis* fue determinada mediante siembra de la bacteria en placas con medio LB y conteo posterior de UFC; de una dilución previa de la bacteria 1: 10,000. En varias placas se colocan individualmente de 3 a 4 perlas de vidrio y sobre estas se agregan 100 µl de medio de cultivo en la dilución mencionada, se esparcen sobre el agar solido que contiene la caja, se retiran las perlas y se dejan incubando las cajas a 37°C durante 10 horas. Posterior a la incubación se hace el conteo de UFC por cada caja para poder sacar un promedio entre estas. La concentración se determina mediante la fórmula.

$$\text{Concentración} = \text{UFC} \times \text{Factor de dilución}$$

Ya que el resultado es producto de 100 µl de cultivo, este se multiplica por el número de veces necesario para llegar a la cantidad de dosis en ml de medio a proporcionar en relación a un promedio de UFC que se suministró de distintas referencias bibliográficas en donde se utilizó *B. subtilis*. La determinación de la curva de crecimiento de la cepa de *B. subtilis* utilizadase realizó mediante una alícuota de 200 µl de cultivo en una dilución 1:10,000 de *B. subtilis* sembrado en 200 ml de medio de cultivo líquido LB a 37 °C. De este medio se retiran cada hora 1600 µl y se colocan en una cubeta rectangular del cual se leyó su absorbancia a 540 nm mediante espectrofotometría. Se toma como testigo o base cero la lectura de la cubeta con medio LB.

