



# **Universidad Nacional del Litoral**

## *Facultad de Ciencias Veterinarias*

Lugar de realización: Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Universidad Nacional del Litoral, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (ICiVet-Litoral UNL-CONICET)

*Tesis presentada para optar por el grado académico de  
Doctor en Ciencias Veterinarias*

### **“Aplicación de diferentes matrices transportadoras de probióticos destinadas a cerdos en producción primaria”**

AUTOR: M.V. Jorge Alberto Zimmermann

DIRECTORA: Dra. Lorena Paola Soto

CO-DIRECTOR: Dr. Laureano Sebastián Frizzo

**2020**

A mis padres por brindarme la posibilidad de seguir estudiando y por estar siempre acompañándome en cada objetivo que me propongo.

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Veterinarias y al Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, por haber proporcionado el lugar físico para la realización de esta tesis. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por otorgarme una beca y posibilitar mi formación académico-profesional

A mi directora Dra. Lorena Soto y mi codirector Dr. Laureano Frizzo por la dedicación y apoyo que han brindado a este trabajo, así como también por su colaboración intelectual. Gracias por la confianza ofrecida.

A la Dra. Ma. Virginia Zbrun, Dr. Marcelo Signorini y Dr. Marcelo Rosmini por la colaboración en las actividades y por compartir sus conocimientos, herramienta valiosa para el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Lic. Carolina Olivero, M.V. Marcia Fusari, Lic. Eugenia Rossler, Lic. Noelí Sirini, Dr. Diego Astesana, Lic. Analía Romero-Scharpen, Lic. Ayelen Berisvil, M.V. Melisa Saluzzo, Dra. Jesica Blajman y Dra. Julia Ruiz, por todas las horas compartidas, por estar en los buenos y los malos momentos, por ser una parte clave de este camino.

A los docentes, pasantes, becarios y alumnos de la Facultad de Cs. Veterinarias que en algún momento colaboraron con su granito de arena para la realización de esta tesis.

A los integrantes de la cátedra de Fisiología, MSc. Gabriela Romano, M.V. Lucila Beltramini y M.V. Nicolás DiLascio, por colaborar de diferentes maneras en este trabajo, acompañandome en el proceso.

Al grupo de trabajo de Porcinos de INTA Pergamino, Constanza Stoppani, Lorena Roldán y su grupo de trabajo, por su colaboración en el desarrollo del ensayo *in vivo*.

A la Dra. Ma. Sol Renna por sus aportes en Citometría de Flujo y por su buena predisposición para colaborar.

A mi familia por ser el amor y el apoyo incondicional, sin ellos esto no hubiera sido posible.

A todos, mi eterno agradecimiento.

# ÍNDICE GENERAL

	Pág.
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	i
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	ii
<b>ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS</b>	ix
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	xiv
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	xvi
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	5
1.1. Producción de carne porcina y sistemas productivos.	6
1.2. Utilización de antibióticos y resistencia.	8
1.3. Implementación de probióticos como alternativa al uso de antimicrobianos en animales de abasto.	9
1.4. Uso de probióticos en cerdos.	11
1.5. Métodos de administración y encapsulación de probióticos.	14
1.6. Monitoreo de los inóculos probióticos.	19
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	20
2.1. Hipótesis.	21
2.2. Objetivo general.	21
2.3. Objetivos específicos.	21
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	22
3.1. Producción de macrocápsulas probióticas.	23
3.1.1. Materiales de pared para la matriz de las macrocápsulas.	23
3.1.2. Evaluación de las características físicas de los materiales de	23



pared individuales.	
3.1.3. Evaluación de los materiales de pared combinados.	25
3.1.4. Evaluación de diferentes métodos de secado de las matrices.	27
3.2. Entrampamiento de <i>L. reuteri</i> DSPV002C.	29
3.2.1. Evaluación de diferentes métodos de secado de <i>L. reuteri</i> DSPV002C en diferentes matrices.	29
3.2.1.1. Microorganismo.	29
3.2.1.2. Condiciones de cultivo.	30
3.2.1.3. Entrampamiento del inóculo en diferentes matrices.	30
3.2.1.4. Condiciones de secado del inóculo en diferentes matrices.	31
3.2.1.5. Análisis estadístico.	31
3.2.2. Evaluación de la viabilidad de macrocápsulas liofilizadas con diferentes proporciones del inóculo:matriz y crioprotectores.	31
3.2.2.1. Entrampamiento del inóculo en diferentes proporciones inóculo:matriz.	32
3.2.2.2. Incorporación de crioprotectores.	32
3.2.2.3. Formación de macrocápsulas y liofilización.	33
3.2.1.4 Determinación de la viabilidad bacteriana.	33
3.2.1.5 Análisis estadístico.	34
3.3. Determinación de la viabilidad bacteriana dentro de las macrocápsulas a través del tiempo.	34
3.3.1. Diseño del experimento.	34
3.3.2. Obtención de imágenes de macrocápsulas mediante microscopía electrónica de barrido.	34

3.3.2.1. Adquisición de imágenes.	35
3.3.3. Análisis estadístico.	35
3.4. Evaluación de la viabilidad de <i>L. reuteri</i> DSPV002C encapsulada en condiciones gastrointestinales simuladas.	36
3.4.1. Producción de macrocápsulas.	36
3.4.2. Producción de cultivo libre.	36
3.4.3. Preparación de soluciones gastrointestinales simuladas.	36
3.4.4. Diseño del experimento.	36
3.4.5. Determinación de la viabilidad bacteriana mediante recuento en placas.	37
3.4.6. Determinación de la viabilidad bacteriana mediante citometría de flujo.	37
3.4.7. Análisis estadístico.	38
3.5. Determinación de la viabilidad bacteriana en las macrocápsulas adicionadas al alimento peletizado.	38
3.5.1. Diseño del experimento.	39
3.5.2. Análisis estadístico.	39
3.6. Evaluación de los efectos probióticos del inóculo encapsulado en cerdos.	40
3.6.1 Animales e instalaciones.	40
3.6.2 Dieta.	41
3.6.3 Microorganismo, obtención de mutantes resistentes a rifampicina y encapsulación.	42
3.6.4. Diseño del experimento.	42
3.6.5. Administración del inóculo.	43

3.6.6. Normas de bioseguridad.	44
3.6.7. Toma de muestras de materia fecal para análisis microbiológicos y moleculares.	44
3.6.8. Análisis microbiológicos en muestras de materia fecal.	44
3.6.8.1. Poblaciones microbianas.	44
3.6.8.2. Análisis de la dinámica poblacional de la microbiota predominante por DGGE.	45
3.6.8.2.1 Extracción de ADN de las muestras de materia fecal.	45
3.6.8.2.2. Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	45
3.6.8.2.3. Preparación de los geles, electroforesis y tinción.	46
3.6.8.2.4. Análisis de geles.	46
3.6.8.2.5. Secuenciación.	47
3.6.9. Hemograma y bioquímica sanguínea.	47
3.6.9.1. Eritrograma y leucograma.	47
3.6.9.2. Perfil de bioquímica sanguínea.	48
3.6.10. Parámetros de crecimiento y medidas corporales.	48
3.6.11. Consumo de alimento, eficiencia de conversión y ganancia de peso.	48
3.6.12. Score fecal y estado de salud.	49
3.6.13. Confirmación de aislamientos de <i>L. reuteri</i> DSPV002C mediante electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE).	49
3.6.13.1. Preparación del ADN genómico.	49

3.6.13.2. Digestión del ADN genómico.	50
3.6.13.3. Electroforesis en campos pulsados.	51
3.6.13.4. Análisis de los patrones de PFGE.	51
3.6.14. Histomorfometría del intestino delgado.	51
3.6.15. Análisis estadístico.	52
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>53</b>
4.1. Producción de macrocápsulas probióticas.	54
4.1.1. Evaluación de las características físicas de los materiales de pared individuales.	54
4.1.2. Evaluación de los materiales de pared combinados.	55
4.1.3. Evaluación de diferentes métodos de secado de las matrices.	68
4.2. Entrampamiento de <i>L. reuteri</i> DSPV002C.	60
4.2.1. Evaluación de diferentes métodos de secado de <i>L. reuteri</i> DSPV002C en diferentes matrices.	60
4.2.2. Evaluación de la viabilidad de macrocápsulas liofilizadas con diferentes proporciones del inóculo:matriz y crioprotectores.	62
4.3 Determinación de la viabilidad bacteriana dentro de las macrocápsulas a través del tiempo.	66
4.3.1. Viabilidad bacteriana dentro de las macrocápsulas a través del tiempo.	66
4.3.2. Obtención de imágenes de macrocápsulas mediante microscopía electrónica de barrido.	69
4.4 Evaluación de la viabilidad bacteriana dentro de las macrocápsulas en condiciones gastrointestinales simuladas.	72
4.4.1. Determinación de la viabilidad mediante recuento en placa.	73

4.4.2. Determinación de la viabilidad mediante citometría de flujo.	74
4.5. Determinación de la viabilidad bacteriana en las macrocápsulas adicionadas al alimento peletizado.	77
4.6. Verificación de la eficiencia del método de conservación mediante un ensayo in vivo en cerdos.	79
4.6.1. Análisis microbiológicos en muestras de materia fecal.	80
4.6.2. Análisis de la dinámica poblacional de la microbiota predominante mediante DGGE.	82
4.6.2.1. Análisis de los geles.	83
4.6.2.2. Secuenciación.	89
4.6.3. Hemograma.	95
4.6.3.1. Eritrograma.	95
4.6.3.2. Leucograma.	100
4.6.4. Perfil de bioquímica sanguínea.	106
4.6.5. Parámetros de crecimiento y medidas corporales.	108
4.6.6. Consumo de alimento, eficiencia de conversión y ganancia de peso.	111
4.6.7. Score fecal y estado de salud.	112
4.6.8. Monitoreo de la cepa <i>L. reuteri</i> DSPV002C mediante electroforesis en gel de campos pulsados.	113
4.6.9. Histomorfometría de intestino delgado.	115
<b>5. DISCUSIÓN</b>	117
5.1. Producción de macrocápsulas probióticas.	118
5.2. Evaluación de la viabilidad bacteriana dentro de las macrocápsulas en condiciones gastrointestinales simuladas.	123

5.3. Determinación de la viabilidad bacteriana en las macrocápsulas junto con el alimento peletizado.	125
5.4. Evaluación de los efectos probióticos del inóculo encapsulado en cerdos.	127
5.4.1. Análisis microbiológicos en muestras de materia fecal.	127
5.4.2. Eritrograma y leucograma.	131
5.4.3. Perfil de bioquímica sanguínea.	133
5.4.4. Parámetros de crecimiento, eficiencia alimentaria y estado sanitario.	135
5.4.5. Monitoreo de <i>L. reuteri</i> mediante PFGE.	137
5.4.6. Histomorfometría del intestino.	138
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>139</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>142</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>173</b>
8.1. Producción científica	174

## ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS\*

A1	Almidón 1% p/v concentración final
A5	Almidón 5% p/v concentración final
A10	Almidón 10% p/v concentración final
A15	Almidón 15% p/v concentración final
A20	Almidón 20% p/v concentración final
A:Ga10	Almidón + Goma arábica 10% p/v concentración final
A:Ga15	Almidón + Goma arábica 15% p/v concentración final
A:Ga20	Almidón + Goma arábica 20% p/v concentración final
AC	Altura a la cruz
ACd	Ancho de caderas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido dexoxirribonucleico ribosómico
AH	Ancho de hombros
ATM	Antimicrobianos
BAL	Bacterias ácido lácticas
Ca <sup>2</sup>	Calcio
CF	Consistencia fecal
CRBAN	Centro regional Buenos Aires norte
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
CICUAE	Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación
CP	Crioprotector
DGGE	del inglés: "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis"; Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
DE	Desvío estandar
DMR	Dosis minima recomendable
DO	Densidad óptica
EC	Eficiencia de conversión
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAO	del inglés: "Food and Agriculture Organization"; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FLA	Fórmula leucocitaria absoluta
FLR	Fórmula leucocitaria relativa

FSC	Forward scatter (dispersion frontal para tamaño celular)
FSC - A	Forward scatter - Area (área)
FSC-H	Forward scatter - Height (altura)
<i>g</i>	Unidad de fuerza centrífuga relativa
G1	Gelatina 1% p/v concentración final
G5	Gelatina 5% p/v concentración final
G10	Gelatina 10% p/v concentración final
G15	Gelatina 15% p/v concentración final
G20	Gelatina 20% p/v concentración final
G:A	Gelatina + Almidón concentración final
G:A5	Gelatina + Almidón 5% p/v concentración final
G:A6	Gelatina + Almidón 6% p/v concentración final
G:A7,5	Gelatina + Almidón 7,5% p/v concentración final
G:A7,5M	Gelatina + Almidón 7,5% p/v + maltodextrina 10% p/v
G:A7,5M 1:1	Gelatina + Almidón 7,5% p/v + maltodextrina 10% p/v con proporción inóculo:matriz 1:1
G:A7,5M 2:1	Gelatina + Almidón 7,5% p/v + maltodextrina 10% p/v con proporción inóculo:matriz 2:1
G:A7,5M 3:1	Gelatina + Almidón 7,5% p/v + maltodextrina 10% p/v con proporción inóculo:matriz 3:1
G:A7,5M 5:1	Gelatina + Almidón 7,5% p/v + maltodextrina 10% p/v con proporción inóculo:matriz 5:1
G:A7,5M 9:1	Gelatina + Almidón 7,5% p/v + maltodextrina 10% p/v con proporción inóculo:matriz 9:1
G:A7,5PS	Gelatina + Almidón 7,5% p/v + permeado de suero 10% p/v
G:A7,5PS 1:1	Gelatina + Almidón 7,5% p/v + permeado de suero 10% p/v con proporción inóculo:matriz 1:1
G:A7,5PS 2:1	Gelatina + Almidón 7,5% p/v + permeado de suero 10% p/v con proporción inóculo:matriz 2:1
G:A7,5PS 3:1	Gelatina + Almidón 7,5% p/v + permeado de suero 10% p/v con proporción inóculo:matriz 3:1
G:A7,5PS 5:1	Gelatina + Almidón 7,5% p/v + permeado de suero 10% p/v con proporción inóculo:matriz 5:1



G:A7,5PS 9:1	Gelatina + Almidón 7,5% p/v + permeado de suero 10% p/v con proporción inóculo:matriz 9:1
G:A9	Gelatina + Almidón 9% p/v concentración final
G:A10	Gelatina + Almidón 10% p/v concentración final
G:A15	Gelatina + Almidón 15% p/v concentración final
G:A20	Gelatina + Almidón 20% p/v concentración final
G:A20M	Gelatina + Almidón 20% p/v + maltodextrina 10% p/v
G:A20M 1:1	Gelatina + Almidón 20% p/v + maltodextrina 10% p/v con proporción inóculo:matriz 1:1
G:A20M 2:1	Gelatina + Almidón 20% p/v + maltodextrina 10% p/v con proporción inóculo:matriz 2:1
G:A20M 3:1	Gelatina + Almidón 20% p/v + maltodextrina 10% p/v con proporción inóculo:matriz 3:1
G:A20M 5:1	Gelatina + Almidón 20% p/v + maltodextrina 10% p/v con proporción inóculo:matriz 5:1
G:A20M 9:1	Gelatina + Almidón 20% p/v + maltodextrina 10% p/v con proporción inóculo:matriz 9:1
G:A20PS	Gelatina + Almidón 20% p/v + permeado de suero 10% p/v
G:A20PS 1:1	Gelatina + Almidón 20 p/v + permeado de suero 10% p/v con proporción inóculo:matriz 1:1
G:A20PS 2:1	Gelatina + Almidón 20% p/v + permeado de suero 10% p/v con proporción inóculo:matriz 2:1
G:A20PS 3:1	Gelatina + Almidón 20% p/v + permeado de suero 10% p/v con proporción inóculo:matriz 3:1
G:A20PS 5:1	Gelatina + Almidón 20% p/v + permeado de suero 10% p/v con proporción inóculo:matriz 5:1
G:A:Ga10	Gelatina + Almidón + Goma arábica 10% p/v concentración final
G:A:Ga15	Gelatina + Almidón + Goma arábica 15% p/v concentración final
G:A:Ga20	Gelatina + Almidón + Goma arábica 20% p/v concentración final
G:Ga5	Gelatina + Goma arábica 5% p/v concentración final
G:Ga10	Gelatina + Goma arábica 10% p/v concentración final
G:Ga15	Gelatina + Goma arábica 15% p/v concentración final
G:Ga20	Gelatina + Goma arábica 20% p/v concentración final
G:Ga20M	Gelatina + Almidón 20% p/v + maltodextrina 10% p/v

Ga1	Goma Arábica 1% p/v concentración final
Ga5	Goma Arábica 5% p/v concentración final
Ga10	Goma Arábica 10% p/v concentración final
Ga15	Goma Arábica 15% p/v concentración final
Ga20	Goma Arábica 20% p/v concentración final
GB	Glóbulos blancos
GC	Grupo control
GDP	Ganancia diaria de peso
GP	Grupo probiótico
GPV	Ganancia de peso vivo
GPS	Ganancia de peso semanal
GRAS	del inglés: "Generally recognize as safe"; Reconocidos como seguros
GR	Glóbulos rojos
H-E	Hematoxilina-Eosina
HCl	Ácido clorhídrico
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HyL	Medio hongos y levaduras
INTA	Instituto nacional de tecnología agropecuaria
IP	Ioduro de propidio
JG	Jugo gástrico
JI	Jugo intestinal
KCl	Cloruro de potasio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotásico
LAMVAB	Medio Lactobacillus Anaerobic MRS con vancomicina y verde de bromocresol
LT	Largo total
LAMVABrif	Medio LAMVAB con rifampicina
mCCDA	Agar modificado con carbón vegetal, cefoperazona y deoxicolate
M	Maltodextrina
MF	Materia fecal
MRS	Medio de Man, Rogosa y Sharpe
mbar	Milibar (unidad de presión)
MEB	Microscopio electrónico de barrido
MN	Mononucleares
MnSO <sub>4</sub>	Sulfato de manganeso

Na <sup>2</sup>	Sodio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de disódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	del inglés “National Center for Biotechnology Information”; Centro Nacional para la Información Biotecnológica
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Peso corporal
PCR	del inglés “Polymerase Chain Reaction”, Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	del inglés “Pulsed-field gel electrophoresis”; Electroforesis en Gel de Campo Pulsado
PMN	Polimorfonucleares
PPA	Peste porcina africana
PS	Permeado de suero
PT	Perímetro torácico
rpm	Revoluciones por minuto
SSC	Side scatter (dispersion lateral para complejidad celular)
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfato
TBE	Tris Borato EDTA
TBX	Triptona-Bilis-X-glucurónido
TE	Tris-EDTA
TGI	Tracto gastrointestinal
UFC	Unidad formadora de colonias
UFC/cáp	Unidad formadora de colonias por cápsula
VBNC	del inglés “Viable but nonculturable”; viable no cultivable
VCM	Volumen corpuscular medio
WHO	del inglés “World Health Organization”; Organización mundial de la salud

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
1	Indicadores de producción porcina en Argentina.	7
2	Principales materiales de pared utilizados para la encapsulación de probióticos.	17
3	Soluciones evaluadas individualmente en sus características físicas para ser utilizadas como materiales de pared para la matriz de las macrocápsulas.	25
4	Soluciones combinadas evaluadas en sus características físicas para ser utilizadas como materiales de pared para la matriz de las macrocápsulas.	27
5	Nomenclaturas utilizadas para la denominación de las diferentes proporciones de inóculo:matriz con los crioprotectores.	33
6	Composición de los alimentos de recría utilizados en el ensayo.	39
7	Composición Centesimal (Base seca) de los alimentos utilizados en el ensayo.	42
8	Primers empleados para la amplificación de ADN de la comunidad de bacterias presentes en la materia fecal de los lechones.	46
9	Características físicas de las soluciones de los materiales individuales en diferentes concentraciones para la conformación de la matriz de macrocápsulas.	55
10	Características físicas de los materiales combinados en diferentes concentraciones para la conformación de la matriz de macrocápsulas probióticas.	57
11	Evaluación de las características físicas de mezclas de gelatina y almidón secadas con diferentes métodos para la conformación de la matriz de macrocápsulas probióticas.	59
12	Porcentaje de pérdida de agua (%m/m) durante el secado de matrices de gelatina y almidón.	60
13	Número de macrocápsulas a incluir cada 0,5 kg o por bolsa de 25 kg de alimento para asegurar el consumo de al menos la DMR (108 UFC/d) por animal, teniendo en cuenta la pérdida de viabilidad en el tiempo.	79

14	Recuentos de poblaciones microbianas en la materia fecal de los lechones.	80
15	Relación entre las poblaciones de microorganismos fecales en lechones durante la recría.	82
16	Índices de diversidad, riqueza y homogeneidad del ecosistema microbiano de la materia fecal de los lechones.	89
17	Porcentaje de identidad de secuencias parciales de 16S ARNr de lechones del d 0 del ensayo, comparadas secuencias presentes en la base de datos del NCBI.	92
18	Porcentaje de identidad de secuencias parciales de 16S ARNr de lechones del d 21 del ensayo, comparadas secuencias presentes en la base de datos del NCBI.	93
19	Porcentaje de identidad de secuencias parciales de 16S ARNr de lechones del d 42 del ensayo, comparadas secuencias presentes en la base de datos del NCBI.	95
20	Parámetros de crecimiento y medidas corporales de lechones a lo largo del ensayo.	108
21	Consumo de alimento, eficiencia de conversión y ganancia semanal de peso en lechones durante el ensayo.	111
22	Altura de vellosidades intestinales, profundidad de criptas y relación V/C en diferentes porciones del intestino delgado de lechones.	116

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Representación esquemática de tipos de encapsulación	16
2	Cortes de macrocápsulas G:A7,5PS 9:1 y G:A20PS 9:1 con recubrimiento en oro (sputtering) preparadas para observación en microscopía electrónica de barrido.	35
3	Imagen satelital de la ubicación de la EEA INTA Pergamino	40
4	Instalaciones y alojamiento de animales en EEA Pergamino INTA.	41
5	Imagen satelital de la ubicación del frigorífico.	43
6	Viabilidad de inóculo probiótico en la matriz G:A20 antes y después de diferentes condiciones de secado.	61
7	Viabilidad de inóculo probiótico en la matriz G:A7,5 antes y después de diferentes condiciones de secado.	62
8	Viabilidad de <i>L. reuteri</i> DSPV002C en macrocápsulas liofilizadas con diferentes proporciones de inóculo:matriz G:A20.	64
9	Viabilidad de <i>L. reuteri</i> DSPV002C en macrocápsulas liofilizadas con diferentes proporciones de inóculo:matriz G:A7,5.	65
10	Interacción entre el tipo de matriz (G:A7,5 9:1 y G:A20 9:1) y diferentes temperaturas de almacenamiento de macrocápsulas (ambiente, refrigeración y congelación) sobre la viabilidad de <i>L. reuteri</i> DSPV002C.	67
11	Viabilidad en el tiempo de <i>L. reuteri</i> DSPV002C en macrocápsulas G:A20 9:1 y G:A7,5 9:1 conservadas a temperatura ambiente, en refrigeración y en congelamiento con diferentes crioprotectores y diferentes condiciones de atmósfera.	68
12	Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de diferentes cortes de macrocápsulas de G:A 7,5PS 9:1 transportadoras de <i>L. reuteri</i> DSPV002.	70
13	Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de diferentes cortes de macrocápsulas G:A20PS 9:1 transportadoras de <i>L. reuteri</i> DSPV002.	72

14	Pérdida de viabilidad de <i>L. reuteri</i> DSPV002C encapsulada en G:A7,5 PS 9:1 y sin encapsular (cultivo libre), en condiciones gastrointestinales simuladas durante 6 h, evaluada mediante recuento en placa	73
15	Curva de calibración para determinar el porcentaje de eventos positivos para Syto9 e IP mediante citometría de flujo utilizando diferentes combinaciones de poblaciones vivas y muertas de <i>L. reuteri</i> DSPV002C.	74
16	Viabilidad de <i>L. reuteri</i> DSPV002C en macrocápsulas y en cultivo libre frente a condiciones gastrointestinales simuladas.	76
17	Pérdida de viabilidad (%) de <i>L. reuteri</i> DSPV002C encapsulada en G:A7,5PS 9:1 y sin encapsular (cultivo libre), en condiciones gastrointestinales simuladas durante 6 h, evaluada mediante citometría de flujo.	77
18	Viabilidad en el tiempo de <i>L. reuteri</i> DSPV002C en macrocápsulas G:A7,5PS 9:1 adicionadas en alimentos peletizados para lechones de recría en fase 1 conservadas a temperatura ambiente en diferentes atmósferas.	78
19	Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los lechones al d 0.	83
20	Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los lechones al d 21.	84
21	Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los lechones al d 42.	85
22	Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los lechones del grupo control, días 0, 21 y 42 del ensayo.	86
23	Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los lechones del grupo probiótico, días 0, 21 y 42 del ensayo.	87
24	Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los lechones del grupo probiótico y grupo control, días 0, 21 y 42 del ensayo.	88

25	Perfiles de bandas de DGGE obtenidas de muestras de materia fecal de lechones a los 0, 21 y 42 d del ensayo con bandas seleccionadas para secuenciar.	90
26	Determinación de hematocrito en lechones a lo largo del experimento	96
27	Determinación de glóbulos rojos en lechones a lo largo del experimento	97
28	Determinación de hemoglobina en lechones a lo largo del experimento.	97
29	Determinación de volumen corpuscular medio en lechones a lo largo del experimento	98
30	Determinación de hemoglobina corpuscular media en lechones a lo largo del experimento	99
31	Determinación de concentración de hemoglobina corpuscular media en lechones a lo largo del experimento.	99
32	Determinación de glóbulos blancos en lechones a lo largo del experimento.	100
33	Determinación de neutrófilos en lechones a lo largo del experimento	101
34	Determinación de eosinófilos en lechones a lo largo del experimento	101
35	Determinación de basófilos en lechones a lo largo del experimento	102
36	Determinación de monocitos en lechones a lo largo del experimento	103
37	Determinación de linfocitos en lechones a lo largo del experimento	103
38	Determinación de Mononucleares (monocitos y linfocitos) en lechones a lo largo del experimento	104
39	Determinación de Polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) en lechones a lo largo del experimento.	105
40	Relación entre la población de neutrófilos y linfocitos de sangre periférica en cerdos del GC y GP a lo largo del experimento.	105
41	Niveles de calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, triglicéridos y colesterol en lechones del GC y GP a los 0, 7, 21 y 42 d.	106
42	Peso corporal de los lechones durante el ensayo	109
43	Parámetros de crecimiento en lechones durante el ensayo	110
44	Consumo de alimento, eficiencia de conversión y ganancia semanal de peso de lechones durante el ensayo.	112



45	Score de materia fecal en lechones durante el ensayo expresados en porcentaje.	113
46	Perfiles electroforéticos obtenidos mediante PFGE.	114
47	Cortes histológicos de intestino delgado de cerdos suplementados y no suplementados con la cepa probiótica.	115

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue contribuir al desarrollo social y económico de los sistemas productivos de animales de granja, a través de la producción de herramientas sanitarias y nutricionales que permitan garantizar la sustentabilidad de los modelos productivos y la inocuidad de las materias primas generadas como primer eslabón de la cadena agroalimentaria. Para esto, se realizó el desarrollo de una matriz transportadora del inóculo probiótico *Lactobacillus reuteri* DSPV002C destinados a cerdos en producción primaria. En primer lugar, se evaluaron diferentes materiales y métodos de secado para la elección de la matriz transportadora. Esto nos permitió seleccionar dos matrices conformadas por gelatina y almidón (G:A) con una concentración final de 7,5% p/v (G:A7,5) y 20% p/v (G:A20) de estos materiales. Luego se evaluó el secado de dichas matrices a temperatura ambiente, en estufa y en liofilización. La liofilización fue el método más eficiente para el secado obteniendo matrices con características de estructura, color, homogeneidad y manipulación necesarias para ser utilizadas en cápsulas transportadoras de microorganismos probióticos. Una vez determinadas las matrices, *L. reuteri* DSPV 002C fue incorporada a las mismas, en diferentes proporciones inóculo:matriz: 1:1; 2:1; 3:1; 5:1 y 9:1. A su vez, a estas mezclas se les incorporó permeado de suero (PS) o maltodextrina (M) como crioprotectores y fueron dispuestas en moldes para formar las macrocápsulas. Finalmente, se determinó la viabilidad de las macrocápsulas, luego del secado por liofilización, obteniendo la mayor cantidad de microorganismos probióticos viables en G:A7,5 y G:A20 utilizando la proporción 9:1 y el PS como crioprotector. El siguiente paso fue evaluar la viabilidad de las macrocápsulas en el tiempo en diferentes condiciones de almacenamiento considerando las variables temperatura (congelación, refrigeración y temperatura ambiente) y atmósfera (envasadas al vacío y sin vacío). La temperatura de almacenamiento que mantuvo más alta la viabilidad fue la congelación. Durante el almacenamiento en estas condiciones, las macrocápsulas G:A7,5PS 9:1 conservadas en vacío, fueron las que mantuvieron los mayores recuentos de bacterias viables (9,3 Log UFC/cáp) hasta los 210 d de almacenamiento. En condiciones de refrigeración, estas mismas macrocápsulas fueron las únicas que mantuvieron la viabilidad del inóculo probiótico por encima de la dosis mínima recomendada (DMR=  $10^8$  UFC/d/animal) envasadas al vacío durante 210 d. A temperatura ambiente, el tiempo de almacenamiento para mantener la viabilidad por encima de la DMR fue de 35 d para las macrocápsulas conservadas en vacío (G:A7,5PS 9:1; G:A20PS 9:1) y sin vacío (G:A20PS 9:1; G:A7,5M 9:1). Luego se evaluó la capacidad de protección ejercida por la macrocápsula sobre el inóculo encapsulado respecto del inóculo libre en condiciones gastrointestinales simuladas. La macrocápsula G:A7,5PS 9:1 fue capaz de

proteger al inóculo *L. reuteri* DSPV002C, mostrando pérdidas de viabilidad de  $0,58 \pm 0,09$  Log UFC/ml comparado con  $1,56 \pm 0,16$  Log UFC/ml obtenido en el cultivo libre luego de 6 h de incubación en dichas condiciones. La viabilidad bacteriana en las macrocápsulas incorporadas al alimento peletizado de los cerdos, conservadas a temperatura ambiente, fue influenciada por el alimento (marca comercial) y mejoró bajo condiciones de vacío. Por lo tanto, se determinó que la cantidad de macrocápsulas que deben adicionarse para asegurar la llegada de la DMR a cada animal, dependerá del alimento, de las condiciones de almacenamiento y de la vida útil del producto. Finalmente se realizó un ensayo *in-vivo* para verificar la eficiencia del método de conservación y administración del inóculo en condiciones de granja. La administración de *L. reuteri* DSPV002C encapsulada durante 42 d, no modificó las poblaciones de BAL, *E. coli*, *Campylobacter* spp. y levaduras en materia fecal. No obstante, la cepa probiótica fue recuperada tanto desde las macrocápsulas como desde la materia fecal de los cerdos por lo que el método de monitoreo de clones resistentes mediante LAMVABrif fue adecuado a nuestro propósito. Aunque el tratamiento probiótico no modificó los parámetros sanguíneos y de crecimiento en los animales, aumentó la relación V/C en el duodeno de los cerdos del GP lo que podría ser explicado por el efecto de la cepa inoculada y sus metabolitos ácidos que favorecen el desarrollo de las vellosidades intestinales y así mejoran la absorción de nutrientes. Es probable que un efecto probiótico más marcado no haya sido observado en nuestro ensayo, debido a que el sacrificio de los lechones fue realizado luego de 42 d. Sería interesante realizar otros ensayos en donde se evalúe el efecto *in vivo* en cerdos bajo condiciones de estrés o experimentalmente infectados por patógenos para poder evaluar el potencial del probiótico bajo esas circunstancias.

Palabras claves: macrocápsulas – probióticos – porcinos.

## ABSTRACT

The aim of this work was to contribute to social and economic development of productive systems of farm animals, through the production of sanitary and nutritional tools that guarantee the sustainability of the productive models and the safety of the raw materials generated as the first link in the agri-food chain. For this, the development of a transporter matrix of the probiotic inoculum *Lactobacillus reuteri* DSPV002C for pigs in primary production was carried out. First, different materials and drying methods were evaluated for the conformation of the transporter matrix. This allowed us to select two potential matrices consisting of gelatin + starch (G:A) with a final concentration of 7,5% (G:A7,5%) w/v and 20% (G:A20%) w/v of these materials. The drying of the matrices at room temperature in a stove and in lyophilization was evaluated. Lyophilization was the most efficient method for drying, obtaining matrices with characteristics of structure, color, homogeneity and handling necessary to be used in capsules to transport probiotic microorganisms. Once the matrices were determined, *L. reuteri* DSPV 002C in different inoculum:matrix ratios, 1:1; 2:1; 3:1; 5:1 and 9:1, was incorporated. These mixtures were incorporated with whey permeate (PS) or maltodextrin (M) as cryoprotectants and were arranged in molds to form the macrocapsules. Finally, the bacterial viability into macrocapsules was determined after drying by lyophilization, obtaining the greatest amount of viable probiotic microorganisms in G:A7,5 and G:A20 using the 9:1 ratio and PS as a cryoprotectant. The next step was the evaluation of the viability of the macrocapsules over time in different storage conditions considering the variables temperature (freezing, cooling and ambient temperature) and atmosphere (vacuum packed and without vacuum). The storage temperature that kept the viability higher was freezing. During storage under these conditions, the G:A7,5PS 9:1 macrocapsules stored in a vacuum were the ones that maintained the highest counts of viable bacteria (9.3 Log UFC/cáp) until 210 d of storage. Under refrigeration conditions, these same macrocapsules were the only ones that maintained the viability of the probiotic inoculum above the minimum recommended dose (DMR =  $10^8$  UFC/d/ animal) vacuum packed for 210 d. At room temperature, the storage time to maintain viability above the DMR was 35 d for the macrocapsules stored in vacuum (G:A7,5PS 9:1; G:A20PS 9:1) and without vacuum (G:A20PS 9:1; G:A7,5M 9:1). The protective capacity exerted by the macrocapsule on the encapsulated inoculum was then evaluated against free inoculum under simulated gastrointestinal conditions. The G:A7,5PS 9:1 macrocapsule was able to protect the inoculum *L. reuteri* DSPV002C, showing viability losses of  $0,58 \pm 0,09$  Log UFC/ml compared with  $1,56 \pm 0,16$  Log UFC/ml obtained in the free culture after 6 h of incubation under said conditions. The bacterial viability in the macrocapsules incorporated

into the pelleted feed of the pigs, stored at room temperature, was influenced by the feed (commercial brand) and improved under vacuum conditions. Therefore, it was determined that the amount of macrocapsules that should be added to ensure the arrival of minimum recommended dose to each animal, will depend on the food, the storage conditions and the shelf life of the product. Finally, an *in vivo* test was carried out to verify the efficiency of the conservation method and administration of the inoculum under farm conditions. The administration of *L. reuteri* DSPV002C encapsulated for 42 d, did not modify the populations of BAL, *E. coli*, *Campylobacter* spp. and yeasts in fecal matter. However, the probiotic strain was recovered both from the macrocapsules and from the fecal matter of the pigs, so the method of monitoring resistant clones using LAMVABrif was adequate for our purpose. Although the probiotic treatment did not change the blood and growth parameters in the animals, the V/C ratio in the duodenum of the pigs of the GP increased, which could be explained by the effect of the inoculated strain and its acidic metabolites that benefits the development of the intestinal villi and thus improve the absorption of nutrients. It is likely that a more marked probiotic effect was not observed in our trial, because the piglets were slaughtered after 42 d. It would be interesting to carry out other studies where the effect is evaluated in pigs under stress conditions or experimentally infected by pathogens in order to evaluate the probiotic's potential under those circumstances.

Keywords: macrocapsules - probiotics - swines.

# 1. Introducción

### **1.1. Producción de carne porcina y sistemas productivos**

A nivel mundial, la producción porcina pronosticaba un crecimiento del 1% para 2019, llegando a 114,6 millones de toneladas, con una expansión continua en China y Estados Unidos. Las exportaciones mundiales también pronosticaban un aumento del 3% en 2019, impulsada por la demanda mundial, con la Unión Europea como principal exportador. Para América Latina, la demanda se fortalecería debido a los precios favorables y las preferencias por el aumento en el consumo de cerdo per cápita (USDA/FAS, 2018). Sin embargo, la realidad mostró una reducción del 4% en la producción global en la primera mitad del 2019, impulsada principalmente por la fuerte reducción en la producción de China. La aparición de brotes de peste porcina africana (PPA) redujo sustancialmente el número de rebaños (USDA/FAS, 2019). Fuera de China, la producción creció moderadamente, con un aumento del 4% en Estados Unidos y 6% en Brasil. Con este panorama, se pronostica que la producción mundial disminuirá un 10% en 2020 debido al impacto de la PPA en los rebaños porcinos en varios de los principales países asiáticos productores. La mayor parte de la reducción en la producción mundial se deberá a una disminución del 25% en la producción de carne de cerdo en China. La mayoría de los principales exportadores de carne de cerdo aumentarán la producción en 2020 debido al aumento de la demanda mundial de importaciones. La producción ha aumentado con fuerza en los Estados Unidos (4%) y Brasil (5%). Se pronostica que las exportaciones mundiales serán 10% más altas. En China, se pronostican un 35% de aumento en las importaciones y representan el 35% de las importaciones mundiales de carne de cerdo (USDA/FAS, 2019).

Argentina ha tenido un sostenido aumento en la producción y consumo de carne porcina. Según datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA/FAS 2018), en el año 2018 Argentina ocupó el puesto número 13 de productores y consumidores a nivel mundial, con una participación aproximada del 0,5% del total. En el país, de acuerdo a cifras aportadas por la Secretaría de Agroindustria del Ministerio de Producción y Trabajo de la Nación (MAGYP, 2018), en los últimos 10 años se duplicó el número de cabezas faenadas pasando de 3.153.829 cabezas en el año 2008 a 6.778.976 en el año 2018 (Tabla 1). Esto se vio reflejado en un aumento del consumo per cápita de 7,62 kg/hab/año a 14,84 kg/hab/año en esos mismos años, así como también un crecimiento de la exportación de 3.638 T a 23.228 T en el mismo período. El consumo argentino de carne porcina ha aumentado en promedio un 10% anual durante los últimos 5 años.

**Tabla 1.** Indicadores de producción porcina en Argentina.

AÑO	FAENA TOTAL (cabezas)	PRODUCCIÓN (T. Eq. Res)	IMPORTACIONES (T)	EXPORTACIONES (T)	CONSUMO (T)	CONSUMO PER CÁPITA (Kg/hab/año)
2008	3.153.829	274.246	35.058	3.638	305.157	7,62
2009	3.339.759	288.853	35.856	5.287	319.422	7,96
2010	3.234.133	279.102	48.080	3.903	323.279	8,06
2011	3.433.378	300.663	54.973	5.377	350.370	8,64
2012	3.818.758	331.000	30.604	6.968	354.636	8,56
2013	4.805.499	416.442	16.794	6.430	426.806	10,40
2014	5.110.083	442.025	8.929	7.568	443.386	10,65
2015	5.523.715	484.199	12.279	8.316	487.323	11,43
2016	5.986.561	522.428	29.743	11.904	541.938	12,72
2017	6.425.216	566.176	38.405	15.780	610.423	14,05
2018	6.778.976	620.549	44.623	23.228	660.512	14,84

(Fuente: SENASA, 2018). T. Eq. Res: toneladas equivalente res.

Existe un incremento sostenido en la producción para cubrir la creciente demanda del mercado, lo que conlleva a la intensificación de los sistemas productivos. Esta crianza intensiva, implica el uso de dietas, instalaciones o prácticas de manejo que generan estresores fisiológicos y psicológicos en los animales, que afectan el equilibrio intestinal negativamente (Moeser *et al.*, 2007).

El destete es uno de los momentos más estresantes que encuentran los animales en los sistemas productivos porcinos (Whittemore y Green, 2006). Además, otros factores que generan estrés en los sistemas productivos intensivos son: el hacinamiento, las instalaciones, la competencia por comida, la separación temprana de las madres y de la camada, el establecimiento de una jerarquía social con lechones de otra camada, cambios de ambiente, cambios abruptos en la dieta a una alimentación artificial y el transporte (Forbes, 1995). Estos factores dificultan la colonización del intestino por una microbiota benéfica y facilitan la actividad de microorganismos patógenos (Rosmini *et al.*, 2004). La incidencia de enfermedades intestinales es especialmente alta en los sistemas de crianza intensiva, donde la exposición a patógenos aumenta debido al confinamiento de grandes cantidades de animales en áreas pequeñas (Frizzo *et al.*, 2011; Signorini *et al.*, 2012). Todo ello trae aparejado consecuencias sobre la salud del animal, disminuyendo la rentabilidad de las granjas y favoreciendo la transmisión de enfermedades a los humanos.



## **1.2. Utilización de antimicrobianos y resistencia**

Para evitar los efectos perjudiciales de los desórdenes sobre el equilibrio microbiológico de los animales, se han utilizado alimentos suplementados con antimicrobianos (ATM) para controlar los microorganismos patógenos. El uso de ATM ha sido implementado en la industria porcina por más de 50 años y la práctica de su utilización como promotores de crecimiento, es una parte integral de las estrategias productivas (Close, 2000). La eficacia de los ATM para mejorar la tasa de crecimiento, aumentar la utilización del alimento y reducir la mortalidad y la morbilidad por enfermedad clínica está altamente demostrada (Cromwell, 2002). En general, es aceptado que los efectos beneficiosos de los ATM como promotores del crecimiento en los cerdos, son por la supresión de algunas bacterias patógenas dentro del tracto gastrointestinal (TGI) de los animales, por alteración de la microbiota intestinal hacia una población que mejora los procesos digestivos con una mejor utilización de alimentos y de los procesos metabólicos, aunque los mecanismos exactos a través de los cuales influyen en el rendimiento del cerdo no han sido completamente entendidos (Doyle, 2001).

Si bien el uso de ATM tiene un impacto positivo en el rendimiento de los cerdos, el uso continuado de los mismos en alimentos para animales puede provocar el desarrollo de cepas bacterianas resistentes a los ATM y problemas de residuos de ATM en productos animales (Bager *et al.*, 2000; Gallois *et al.*, 2009), si no se han respetado los tiempos de espera. Entre las bacterias que generan resistencia, pueden encontrarse bacterias patógenas no solo de animales sino también de humanos (Van der Fels-Klerx *et al.*, 2011), o patógenas para ambos. Estas cepas resistentes pueden transferirse a los humanos, lo que puede afectar la efectividad de ciertos ATM cuando se les da un uso clínico, en el tratamiento de enfermedades humanas (Bager *et al.* 2000; Carroll 2003).

Muchos estudios han demostrado la existencia de infección en humanos por bacterias resistentes provenientes de animales (Nhung *et al.*, 2016). La diseminación de microorganismos resistentes a ATM a través de la cadena agroalimentaria, así como la presencia de residuos en los alimentos, ha desatado la presión de consumidores y entes reguladores para que el sector de la producción de alimentos reduzca o elimine la utilización de los antimicrobianos. Muchos países han prohibido o están prohibiendo la inclusión de ATM en las dietas porcinas como un medio habitual de promoción del crecimiento de los animales (Thacker, 2013). Tal es el caso de la Unión Europea, que prohibió el uso de ATM en los alimentos para cerdos en el año 2006 (Kreuzer *et al.*, 2014). Para Argentina, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) dio de baja los registros y certificados de uso y la comercialización de alimentos destinados a animales con

ATM, antiparasitarios y coccidiostáticos (resolución SENASA 594/2015). Sin embargo, la interrupción del uso de ATM como promotores del crecimiento puede reducir el rendimiento de la granja y aumentar el uso terapéutico de ATM porque las enfermedades entéricas en particular son difíciles de controlar en estos sistemas intensivos sin el uso de ATM en los alimentos (Casewell *et al.* 2003).

Los efectos beneficiosos de los promotores del crecimiento son importantes en la dieta de los lechones destetados, es por eso que los efectos adversos de su eliminación, son mayores en esta categoría (Kjeldsen, 2002). Por esta razón es necesaria la búsqueda de alternativas al uso de los ATM como promotores del crecimiento. En las últimas décadas se han realizado una gran cantidad de investigaciones centradas en el desarrollo de alternativas al uso de los ATM para mantener la salud y el rendimiento de los cerdos (Thacker, 2013) y otros animales de abasto (Verstegen y Williams, 2002; Huyghebaert *et al.*, 2011).

### **1.3. Implementación de probióticos como alternativa al uso de antimicrobianos en animales de abasto**

Una alternativa al uso de los antimicrobianos es la implementación de probióticos; estos pueden ayudar a mejorar el balance intestinal y, por lo tanto, la defensa natural del animal contra los patógenos, lo cual se ve reflejado en una mayor rentabilidad de las granjas (Lee *et al.*, 2014).

La definición de probiótico según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización mundial de la salud (WHO) es: "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped" (Bajagai *et al.*, 2016).

El término probiótico, es de naturaleza genérica e incluye a levaduras, bacterias o la combinación de éstas, que actúan para manipular el ambiente gastrointestinal y mejorar la salud del huésped (Kabir, 2009). Cuando se habla de "cantidades adecuadas", no hay un consenso sobre el nivel mínimo para la funcionalidad propuesta (Champagne *et al.*, 2005). En un trabajo de Vinderola *et al.* (2000), se cita que un producto lácteo debe contener al menos  $10^6$  UFC/ml de bacterias probióticas en el momento de ser consumido y el consumo debe ser superior a 100 g/d. Ashraf and Shah (2011) citan también una dosis de  $10^6$  UFC/g o ml, suponiendo un consumo de 100 g o ml diarios de alimentos procesados. Esto resulta en que una dosis mínima recomendada (DMR) de  $10^8$  UFC/d sería adecuada para conferir los efectos benéficos (Jafari *et al.*, 2017). Kechagia *et*

*al.* (2013) citan una dosis de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/d para que el efecto probiótico sea generado en el consumidor.

Para que los microorganismos sean considerados como probióticos, deben ser de carácter Generally Regarded as Safe (GRAS) es decir reconocidos como seguros para la salud (Kothari *et al.*, 2019) y debe haber evidencia científica que demuestre los efectos beneficiosos sobre la salud del huésped (Guarner *et al.*, 2010).

Existen diferentes clasificaciones de probióticos, según la FAO (Bajagai *et al.*, 2016); se reconocen probióticos bacterianos (*Lactobacillus*, *Bifidobacterias*, *Bacillus*) y no bacterianos (*Aspergillus*, *Saccharomyces*); formadores de esporas (*Bacillus*) y no formadores de esporas (*Lactobacillus*); multiespecie (conformado por múltiples especies microbianas) y especies individuales (conformado por una especie); multicepa (integrado por más de una cepa microbiana) y monocepa (integrado por una sola cepa microbiana); autóctonos, cuando no son habitantes normales del TGI del animal y autóctonos cuando si lo son.

La definición de probiótico también indica que “confiere un beneficio para la salud del huésped”. Reid (2016) dice que no hay una respuesta simple para explicar el mecanismo de acción de los probióticos dada la variedad de cepas y formulaciones existentes. Este autor cita por ejemplo a *L. reuteri* SD2112 (ATCC 55730) y *L. reuteri* RC-14, las cuales son genética y funcionalmente diferentes y tienen mecanismos de acción también diferentes; una cepa es productora de una bacteriocina y la otra es productora de un biosurfactante. Sin embargo, hay mecanismos de acción comunes que pueden ser aplicados al general de los probióticos.

Uno de los mecanismos de acción de los probióticos es la exclusión competitiva de patógenos, en la cual una especie compite por los sitios receptores en el TGI frente a otras especies (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Esta exclusión puede ser generada por la reducción del pH luminal, que genera un ambiente fisiológicamente restrictivo para el crecimiento de otros microorganismos y/o también a través de la competencia por nutrientes y producción de bacteriocinas o sustancias similares (Collado *et al.*, 2010). Han sido descritas varias bacteriocinas producidas por *Lactobacillus* spp. (Klaenhammer, 1988), algunas inhiben bacterias Gram-positivas, otras inhiben Gram-positivas y negativas, así como también levaduras y mohos (Nemcova, 1997). Los probióticos pueden actuar mediante actividad enzimática, es decir producción de enzimas con efectos benéficos. Los lactobacilos y las bifidobacterias presentan una variada actividad enzimática, con  $\beta$ -galactosidasa como la más típica (Plaza-Díaz *et al.*, 2019). La actividad enzimática contribuye a un mejor aprovechamiento de nutrientes, así como también a la

eliminación de compuestos nocivos para el organismo. Otro mecanismo de acción es a través de la producción de ácidos grasos de cadena corta. En modelos animales con lesión de mucosas, la administración de probióticos se asoció a un aumento del lactato fecal, acetato, propionato y butirato, con atenuación de lesión en las mucosas (Trindade *et al.*, 2018). Pueden influir también en las interacciones entre las células de la mucosa mediante la mejora de la función de barrera intestinal a través de la modulación de la fosforilación proteica del citoesqueleto y de las uniones estrechas (Ng *et al.*, 2009). La administración de probióticos también puede favorecer la modulación de la microbiota intestinal modificando las poblaciones de microorganismos (Frizzo *et al.*, 2011; Soto *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2012; Pajarillo *et al.*, 2015). Otro mecanismo de acción de los probióticos es mediante la modulación del sistema inmune. Las bacterias probióticas interactúan con las células epiteliales, dendríticas, monocitos/macrófagos y linfocitos a través de la producción de moléculas con funciones inmunomoduladoras y antiinflamatorias (D'amelio *et al.*, 2017). El efecto de la administración de probióticos sobre el sistema inmune es complejo. Halloran y Underwood (2019) indicaron que concluir que los probióticos tienen un efecto supresor uniforme sobre el sistema inmune es demasiado simplista, ya que pueden actuar disminuyendo la respuesta inmune, y/o estimulando determinadas líneas celulares.

Valeriano *et al.* (2017) en su revisión, citan los principales beneficios de la utilización de *Lactobacillus* spp. en la crianza de cerdos. Entre éstos se mencionan el incremento en la ganancia de peso y la eficiencia de conversión, la reducción de coliformes fecales, la mejora en la performance de crecimiento luego del destete, las mejoras en la resistencia a la infección frente a diversos patógenos (*E. coli*, *Salmonella* spp.), la reducción de la incidencia de diarrea, la mejora en la digestibilidad, la mejor calidad de carnes y carcasas, la modulación de la respuesta inmune y las mejoras en la morfología intestinal, entre otros efectos.

#### **1.4. Uso de probióticos en cerdos**

La implementación de probióticos en producción porcina se da en todas las fases productivas. Se utilizan para mejorar el rendimiento, evitar enfermedades (principalmente intestinales), aumentar la calidad de los productos y para reducir la contaminación ambiental (Barba-Vidal *et al.*, 2019). En producción porcina, muchos de los estudios realizados han demostrado que la administración de probióticos mejoró la ganancia diaria de peso, la ingesta diaria de alimento y la conversión alimenticia de los cerdos (Liao y Nyachoti, 2017).

Muchos estudios han utilizado probióticos en sistemas productivos porcinos. Bogere *et al.* (2019) citan los principales géneros de microorganismos comúnmente utilizados en nutrición porcina, con las especies más utilizadas; *Lactobacillus* spp. (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. salivarius*, *L. reuteri*), *Bacillus* spp. (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*), *Bifidobacterium* spp. (*B. longus*, *B. animalis*, *B. lactis*), *Escherichia coli* (cepa Nissle 1917); *Enterococcus faecium* y *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* var. *Boulardii*).

En un meta-análisis realizado por nuestro equipo (Zimmermann *et al.*, 2016) para evaluar el efecto probiótico sobre la performance de crecimiento en cerdos, tomamos la ganancia diaria de peso (GDP) y la eficiencia de conversión (EC) como indicadores. Se incluyeron 32 estudios sobre la GDP y 29 estudios para la EC. De acuerdo con nuestro metanálisis, la suplementación con probióticos tuvo un efecto beneficioso sobre la GDP (29,939 g/d más en grupos suplementados con probióticos) y sobre la EC (96 g menos de alimento consumido / kg de aumento de peso).

El análisis de la GDP incluyó un total de 67 experimentos, con 38 realizados antes del 2010 y los restantes 29 después del 2010. La GDP de los cerdos tratados con probióticos y control fueron 432,89 g/d (DE=204,75) y 404,27 g/d (DE=202,32) respectivamente. La utilización de probióticos con preparados mono-cepa y multi-cepa mejoraron en ambos casos la GDP. Teniendo en cuenta las especies probióticas utilizadas, se encontraron mejoras en la GDP con la utilización de *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp. y *Saccharomyces* spp., mientras que la utilización de *Bifidobacterium* spp., no indujo un efecto positivo sobre la GDP. Considerando el método de administración, se encontraron resultados positivos cuando el probiótico se incluía en el agua de bebida y también con el alimento, mientras que si se incluía en sustituto lácteo no se encontraron diferencias. Con respecto al periodo de administración, se encontraron mejoras en la GDP cuando se suplementaba con probióticos desde el destete hasta los 18 kg y en cerdos en recría con más de 50 kg. Por otra parte, durante la lactación y en el periodo de crecimiento (18 a 50 kg) no hubo mejoras en la GDP. Teniendo en cuenta las características de producción de diferentes razas o cruza de cerdos, el efecto probiótico sobre la GDP solo se pudo observar cuando se utilizaron razas maternas (por ejemplo, Chester White, Landrace, Yorkshire) y cruza de razas prolíficas y de rápido crecimiento (por ejemplo, Berkshire, Duroc). El efecto benéfico se observó también en la crianza en todos los tipos de pisos evaluados (concreto, plástico, acero), a ambos rangos de temperaturas (22 - 25 °C; 25 - 31 °C) y en diferentes densidades de animales (0,1 – 0,7 cerdos/m<sup>2</sup>; >0,7 cerdos/m<sup>2</sup>) evaluadas.

Para el caso de la EC, se incluyeron en el análisis 60 experimentos, de los cuales 26 fueron realizados antes del 2010 y los 34 restantes después del 2010. La EC también fue mejor en los

animales tratados con probióticos en comparación a los controles. La EC de los cerdos tratados con probióticos y control fueron 1,98 kg de alimento/kg de peso corporal (DE = 0,56 kg de alimento/kg de peso corporal) y 2,11 kg de alimento/kg de peso corporal (DE = 0,60 kg de alimento/kg de peso corporal), respectivamente. El efecto probiótico se encontró en los estudios que usaron probióticos tanto mono-cepa como multi-cepa. Teniendo en cuenta las especies de probióticos utilizadas, se encontró mejoras en la EC con la utilización de *Bacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* y *Saccharomyces spp.*, mientras que la utilización de *Bifidobacterium spp.*, no indujo un efecto positivo sobre la EC. Teniendo en cuenta el periodo de administración, se encontró un efecto positivo sobre la EC, en la suplementación desde el destete hasta la terminación de los cerdos, mientras que la administración durante la lactancia, no mostró un efecto positivo considerando los estudios incluidos. Con respecto a las características de producción de diferentes razas o cruza de cerdos, el efecto probiótico sobre la EC solo se pudo observar cuando se incluyeron en experimentos razas maternas y cruza de razas maternas con razas paternas terminales. El efecto benéfico se observó también en la crianza en diferentes temperaturas (22 - 25 °C; 25 - 31 °C) y con diferentes densidades de animales (0,1 – 0,7 cerdos/m<sup>2</sup>; >0,7 cerdos/m<sup>2</sup>).

El número de cerdos es un factor limitante en muchos experimentos, que puede impactar directamente en la variabilidad de los resultados. El número de animales incluidos en un estudio, afecta la probabilidad de encontrar diferencias significativas cuando realmente hay un impacto por probióticos. En nuestro meta-análisis, el efecto probiótico fue evidente, independientemente el número de animales tanto para la GDP como para la EC.

La utilización de probióticos mono-cepa o multi-cepa es otro factor importante. La actividad de los microorganismos probióticos puede variar y por ello la funcionalidad de un inóculo probiótico de múltiples cepas podría ser más eficaz y consistente que un inóculo mono-cepa (Timmerman *et al.*, 2005). Una de las ventajas de un inóculo de múltiples cepas es la posibilidad de efectos complementarios de sus propiedades probióticas. Sanders y Huisin't Veld (1999) sugirieron que los efectos de los probióticos sobre la salud son específicos de géneros, especies y cepas, y propusieron que los probióticos multi-cepa y multi-especies podrían ser más efectivos que los probióticos mono-cepa. Sin embargo, los cerdos involucrados en nuestro estudio que recibieron probióticos mono-cepa o multi-cepa tuvieron un rendimiento similar para ambas variables analizadas.

Algunos de los principales usos de probióticos en los sistemas productivos porcinos son: aumentar el consumo de alimento en las cerdas durante los últimos periodos de preñez,

(Hayakawa *et al.*, 2016; Jeong *et al.*, 2015; Kritas *et al.*, 2015), para la mejora del tamaño de las camadas, (Apic *et al.*, 2014; Baker *et al.*, 2013; Jeong *et al.*, 2015), para mejorar la condición corporal hacia el final de la lactación (Bohmer *et al.*, 2006; Kritas *et al.*, 2015) y para la reducción de patógenos intestinales en las cerdas y los lechones (Baker *et al.*, 2013; Kritas *et al.*, 2015). En los cerdos de engorde, la implementación de probióticos se ha realizado para mejorar la calidad de la carne y mejorar la digestibilidad (Černauskienė *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2006; Giang *et al.*, 2011) así como también para mejorar la ganancia de peso (Davis *et al.*, 2008; Gebru *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2010). Los lechones son la categoría de animales en la cual más se utilizan los probióticos. Se han empleado para modular la microbiota (Scharek-Tedin *et al.*, 2015; Upadhaya *et al.*, 2017; Ahmed *et al.*, 2014), para protección contra patógenos (Upadhaya *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2016), modulación de la inmunidad (Naqid *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016), mejorar parámetros productivos y conversión alimenticia (Hayakawa *et al.*, 2016; Konstantinov *et al.*, 2008).

Para que un animal crezca y no enferme, es necesario un intestino sano, que pueda utilizar los nutrientes de la dieta de manera eficiente para un mejor rendimiento productivo. Con un intestino sano, el animal puede tener una mejor digestión y absorción de nutrientes (Willing *et al.*, 2012). Además de su función digestiva, el TGI contribuye a la función inmune del animal, ya que el intestino es una línea de defensa contra patógenos del entorno. (Veizaj-Delia y Pirushi, 2012). Las primeras semanas de vida de los animales, son críticas debido al incompleto desarrollo del intestino y del sistema inmunológico, siendo susceptible al estrés y a la invasión por microorganismos patógenos (Levast *et al.*, 2014). El proceso de destete, más precisamente el cambio de alimento líquido a sólido, causa una dramática desorganización en la composición de la microbiota intestinal. La suplementación probiótica en esta etapa del lechón favorece un desarrollo temprano y controlado de la microbiota, lo que reduce los efectos adversos del destete sobre la performance de crecimiento (Lee *et al.*, 2014).

### **1.5. Métodos de administración y encapsulación de probióticos**

La forma de administración de probióticos podría ser un factor que afecte la performance de crecimiento. En nuestro meta-análisis, los probióticos demostraron tener efecto positivo sobre la GDP cuando fueron incluidos en la alimentación y en el agua. Sin embargo, no se demostró que la adición al sustituto lácteo tenga un impacto positivo. Con respecto a la administración de probióticos en el agua potable, generalmente se informa que produce un aumento menor en la GDP en comparación con su administración a través de la alimentación (Jin *et al.*, 2000; Kalavethy

*et al.*, 2003). En el caso de los lechones lactantes, se utiliza en general la administración oral de probióticos en la formulación de pasta o gel (Jørgensen, 2014). En cambio, para los lechones en edad de destete, es posible lograr una administración de probióticos más constante a través del pienso o del sustituto lácteo. También la suplementación probiótica se puede hacer sobre las madres y sobre los cerdos en crecimiento y terminación mediante la suplementación en agua de bebida o en el alimento, lo cual permite un mejor aprovechamiento de la comida y por lo tanto mayores rendimientos productivos. La administración a las madres tiene la ventaja adicional de que los probióticos se transmiten a la camada, la cual tendrá una mejor salud intestinal al momento del destete (Starke *et al.*, 2013).

Para que los microorganismos probióticos puedan ejercer sus efectos beneficiosos sobre la salud del huésped, es necesario que se mantengan viables hasta llegar al sitio de acción. Los probióticos deben ser metabólicamente estables y activos, y sobrevivir a las condiciones estomacales (bajo pH, presencia de pepsina) e intestinales (presencia de sales biliares y enzimas digestivas) (Sanz, 2007). Además, tienen que mantenerse viables hasta el momento de su administración. Su viabilidad se ve comprometida aún más durante el almacenamiento, por la presencia de humedad, oxígeno y alta temperatura, lo que lleva a una disminución en el número de microorganismos viables (Tripathi *et al.*, 2014). Estos requerimientos plantean la necesidad del estudio de las características tecnológicas de las cepas probióticas, en cuanto a la viabilidad de las mismas a través del tiempo y a través de pasaje por el tracto gastrointestinal aplicando metodologías de conservación adecuadas.

Para satisfacer los requerimientos de protección de los probióticos durante su periodo de almacenamiento y contra las barreras intestinales, han sido desarrolladas diversas técnicas de encapsulación. La encapsulación puede definirse como un proceso fisicoquímico o mecánico para atrapar una sustancia en un material y producir partículas con diámetros micrométricos (microencapsulación), en escala milimétrica (Lakkis, 2007) tal como las macrocápsulas (Soto *et al.*, 2011). La mayoría de las tecnologías de inmovilización se aplican a bacterias incorporadas a alimentos destinados a humanos, en las cuales se busca un tamaño de encapsulación lo suficientemente pequeño para ser imperceptible por el paladar (Astesana *et al.*, 2018). Sin embargo, la producción de cápsulas de un tamaño mayor, similar al alimento iniciador de los animales, puede facilitar la administración a estos, así como también mantener la viabilidad bacteriana (Soto *et al.*, 2011).

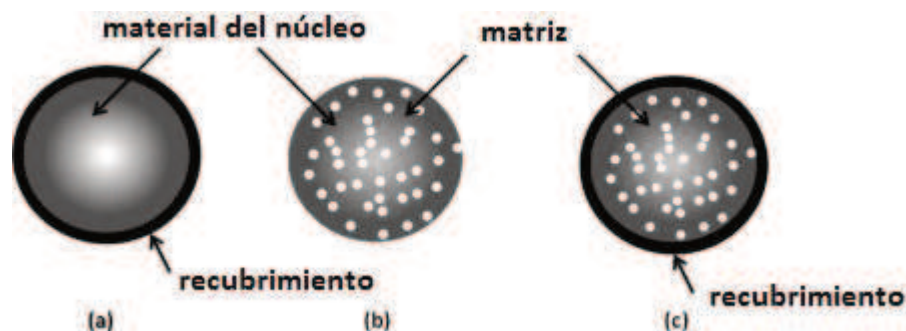
Actualmente existen muchas tecnologías desarrolladas de microencapsulación (Martín *et al.*, 2015; Ross *et al.*, 2005; de Vos *et al.*, 2010). Entre las más utilizadas se incluyen técnicas de



extrusión, para la cual se prepara una solución, generalmente un hidrocoloide, y se le agregan los microorganismos para luego extruir la suspensión a través de una jeringa en una solución para endurecer (Heidebach *et al.*, 2012). Las emulsiones con gelificación es otra técnica de encapsulación. En esta tecnología, una fase discontinua (polímero) se agrega a un gran volumen de aceite (fase continua) y la mezcla se homogeneiza para formar una solución de agua en aceite. Luego el polímero soluble en agua se insolubiliza para formar las partículas dentro de la fase oleosa (Heidebach *et al.*, 2012). El lecho fluidificado se utiliza también para la encapsulación de probióticos. Esta técnica consiste en la utilización de un flujo de aire que crea un movimiento de las partículas, con aspersion para crear el recubrimiento del material (Martín *et al.*, 2015). El liofilizado es otra de las técnicas utilizadas para la encapsulación de probióticos; consiste en el congelado de las células en primer lugar y luego el secado mediante sublimación a alto vacío (Santivarangkna *et al.*, 2007). Otra de las técnicas de encapsulación es el secado por pulverización; esta técnica consiste en la dispersión del material, formando una emulsión y luego la homogeneización del líquido, seguido de una atomización de la mezcla en una cámara de secado (Martín *et al.*, 2015).

Entre los tipos de encapsulación, se citan el de tipo reservorio y el de tipo matriz (Burgain *et al.*, 2011). La encapsulación tipo reservorio tiene una cubierta alrededor del material del núcleo, el cuál es el agente activo a encapsular. En la de tipo matriz, el agente activo se mezcla con el material de pared utilizado para el entrapamiento. De esta manera, el agente activo queda retenido en el núcleo de la cápsula y también en la superficie (Figura 1). Además, un tercer tipo se forma por la combinación de los dos anteriores: la matriz con recubrimiento externo (Zuidam y Shimoni, 2009).

**Figura 1.** Representación esquemática de tipos de encapsulación



a. Encapsulación tipo reservorio; b. Encapsulación de tipo matriz; c. Encapsulación tipo matriz recubierta. Adaptado de Burgain *et al.*, 2011.

Un factor importante a tener en cuenta, es que los materiales utilizados para encapsular a los microorganismos probióticos deben ser de calidad alimentaria si van a ser utilizados en la industria alimentaria. Además, deben ser capaces de formar una barrera que pueda proteger a la sustancia que se va a encapsular (Burgain *et al.*, 2011). Por lo tanto, estos materiales deben ser reconocidos, al igual que los microorganismos probióticos, como de status GRAS (Serna-Cock y Vallejo-Castillo, 2013). Diversos materiales han sido utilizados para la encapsulación de probióticos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Principales materiales de pared utilizados para la encapsulación de probióticos.

Clasificación	Materiales
<b>Polisacáridos</b>	Agar, alginato de sodio, almidón, carragenina, chitosán, celulosa, dextrano, goma arábica
<b>Oligosacáridos</b>	Jarabe de maíz, maltodextrina
<b>Disacáridos</b>	Sucrosa
<b>Lípidos</b>	Ceras, diglicéridos, monoglicéridos, grasas, ácido esteárico, triestearina y aceites
<b>Proteínas</b>	Gluten, caseína, gelatina, proteínas de suero lácteo, albúmina

Adaptado de Serna-Cock y Vallejo-Castillo (2013).

Debido a que los materiales de pared utilizados para el entrapamiento de los agentes activos, representan un alto porcentaje de los materiales que forman la cápsula, el costo de los mismos, influirá directamente en el costo final del producto. Entre los materiales de bajo costo utilizados para la encapsulación, se incluyen los almidones, la inulina, pectina y la mayoría de los carbohidratos (De Vos *et al.*, 2010). Otros materiales, obtenidos en industrias locales, también son factibles de implementar por su costo accesible, tales como gelatina, almidón pregelificado, maltodextrina (M) y permeado de suero (PS). A continuación se describen las características de algunos materiales utilizados para la formación de las cápsulas:

- La gelatina o hidrolizado de colágeno, es un hidrocoloide miscible que se utiliza como agente gelificante. Está compuesto por proteína derivada de hueso o piel y se obtiene por

hidrólisis parcial del colágeno, tanto de ganado vacuno como de ganado porcino. Se lo utiliza como agente gelificante y fuente de proteínas. La gelatina además tiene un alto poder de reticulación por la presencia de grupos amino primarios (Shu *et al.*, 2006).

- El almidón pregelificado es un polisacárido espesante instantáneo y tiene estructura de gel a temperatura ambiente. Para su obtención, luego de extraer el almidón del grano de maíz (*Zea mays*) mediante molienda húmeda con temperatura, se lo seca a vapor. El proceso irreversible de gelificación permite que el almidón forme una estructura de gel en presencia de agua fría. En la industria alimenticia se lo utiliza como ingrediente nutritivo y agente reológico. Por hidrólisis total o enzimática produce dextrosa como único glúcido (Majzoubi *et al.*, 2016).
- La maltodextrina es una mezcla de polímeros de glucosa que se forman como resultado de la hidrólisis parcial del almidón. Está formado por una mezcla de varios oligómeros de glucosa, los cuales contienen de 5 a 10 unidades. Se utiliza en la industria como encapsulante, agente de relleno, agente reológico, como ayuda para procesos de secado por aspersión y para mejorar la solubilidad. Es un material de uso común para la microencapsulación de probióticos (Ray *et al.*, 2016) y como crioprotector (Vera *et al.*, 2015).
- El permeado de suero es un subproducto energético, líquido, derivado del suero de queso y caseína. Se obtiene mediante secado por pulverización y se utiliza en una variedad de aplicaciones alimentarias. Tiene un alto contenido en lactosa, minerales y traza de proteínas de suero. Se utiliza en la industria alimenticia por su capacidad de sustituir otros sólidos de leche más caros sin alterar el sabor o la textura de los productos alimenticios. El PS ha sido utilizado en la encapsulación de probióticos y como crioprotector (Doherty *et al.*, 2011).
- La goma arábica es un polímero ramificado de galactosa, ramnosa, arabinosa y ácido glucurónico. Se extrae de las ramas de los árboles de *Acacia senegal* y *Acacia seyal*. Es un exudado gomoso seco comestible con alta solubilidad y se utiliza en la industria alimentaria como estabilizador, emulsionante, agente aromatizante, espesante y agente de acabado de superficies (Randall *et al.*, 1989; Phillips *et al.*, 1996). Si bien la goma arábica no es un material económico, es uno de los más utilizados para la encapsulación y la interacción gelatina/goma arábica es una de las más estudiadas (Xiao *et al.*, 2014).

## 1.6. Monitoreo de los inóculos probióticos

Cuando se busca evaluar la administración de un inóculo probiótico en animales y determinar su efectividad, en primer lugar, se debe implementar alguna técnica que permita monitorear la presencia de los probióticos en el sitio de acción. Es necesario poder determinar la cantidad de bacterias que llegan viables al intestino, diferenciándolas de la microbiota indígena propia del animal. Una técnica utilizada para este monitoreo, es el uso de cepas probióticas mutantes. La técnica consiste en la marcación de la cepa probiótica por resistencia a un antibiótico (Demecková *et al.*, 2002). La generación de mutantes resistentes a rifampicina, puede facilitar la enumeración y el aislamiento de los microorganismos integrantes del inóculo, y permite diferenciarlos de la microbiota intestinal indígena (Blajman, *et al.*, 2015). Otros autores han utilizado la generación de cepas probióticas resistentes para su monitoreo. Fusari *et al.* (2016a) utilizó la cepa *L. reuteri* DSPV002 resistente a rifampicina en ensayos con cerdas y lechones para su monitoreo y recuperación en materia fecal. Frizzo *et al.* (2011) y Astesana (2018) generaron cepas resistentes de *Lactobacillus spp.* y *Pediococcus, spp.* con buenos resultados en la recuperación de las cepas y diferenciación del resto de la microbiota de bacterias ácido lácticas (BAL).

Otra metodología que se utiliza para el monitoreo de las bacterias administradas es la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). PFGE es el método de referencia empleado para el genotipado bacteriano y se usa comúnmente para tipificar bacterias de interés (Gosiewski y Brzychczy-Wloch 2015). La técnica permite la separación de grandes moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) después de digerir el genoma completo con enzimas de restricción de corte poco frecuente y mediante la electroforesis en gel de campo pulsado (Sharma-Kuinkel *et al.*, 2016). Esta técnica permite la identificación a nivel de cepas, lo que permite diferenciar entre cepas de la misma especie. Esta técnica ha sido utilizada, entre otros, por Blajman *et al.* (2015) para el monitoreo de la cepa administrada a pollos, demostrando un 100% de similitud entre la cepa administrada y la recuperada desde la materia fecal en diferentes momentos del estudio.

A partir de los principios mencionados, resulta interesante estudiar la encapsulación de inóculos probióticos destinados a cerdos para determinar la protección ejercida por las cápsulas durante el almacenamiento y el pasaje por el tracto gastrointestinal. Así mismo, es de interés determinar la factibilidad de la incorporación de las cápsulas probióticas como suplemento en los alimentos destinados a los cerdos. A su vez, la obtención de una cápsula probiótica, permitirá la administración del inóculo en condiciones de campo y determinar los efectos producidos en los animales.

## **2. Hipótesis y objetivos**

## **2.1. Hipótesis.**

La aplicación de una matriz transportadora y la liofilización como proceso de conservación, permitirá mantener viable el inóculo probiótico a administrar a los cerdos. El suministro del mismo, contribuirá a mantener un balance intestinal y mejorar las defensas naturales de los animales frente a patógenos.

## **2.2. Objetivo general:**

Contribuir al desarrollo social y económico de los sistemas productivos de animales de granja, a través de la producción de herramientas sanitarias y nutricionales que permitan garantizar la sustentabilidad de los modelos productivos y la inocuidad de las materias primas generadas como primer eslabón de la cadena agroalimentaria.

## **2.3. Objetivos específicos:**

1. Evaluar diferentes matrices para la producción de macrocápsulas probióticas.
2. Estudiar el efecto de la liofilización de las macrocápsulas sobre la viabilidad de la cepa.
3. Evaluar diferentes condiciones de almacenamiento (temperatura y atmósfera) de las macrocápsulas y estudiar la viabilidad de la cepa encapsulada a través del tiempo.
4. Evaluar la viabilidad de las bacterias encapsuladas frente a condiciones gastrointestinales simuladas.
5. Determinar la viabilidad del inóculo encapsulado adicionado al alimento transportador.
6. Verificar la eficiencia del método de conservación y administración del inóculo mediante un ensayo in vivo en lechones.

## **3. Materiales y métodos**

### **3.1. Producción de macrocápsulas probióticas**

Con el objetivo de seleccionar una matriz adecuada para la conformación de macrocápsulas transportadoras de *Lactobacillus reuteri* DSPV002C, se evaluaron diferentes materiales de pared, combinaciones de éstos y diferentes métodos de secado de los mismos.

#### **3.1.1. Materiales de pared para la matriz de las macrocápsulas**

Para la conformación de la matriz de las macrocápsulas transportadoras de probióticos, se evaluaron cinco materiales con propiedades adecuadas para tal fin. Las características de los materiales utilizados se describen a continuación:

- La gelatina utilizada (PB LEINER PB GELATINS, Santa Fe, Argentina), en su composición tiene > 85 % proteína, < 15 % agua y < 2% ceniza inorgánica ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y otros). Se presenta en forma de polvo granular de color amarillo pálido. Tiene un leve olor característico a caldo (“bouillon”). Es altamente soluble en agua por encima de 40°C e insoluble en grasas (solvente o aceite).
- El almidón de maíz pregelificado (“GLUTAGEL” Glutal S.A., Esperanza, Argentina) es de viscosidad instantánea y textura suave. Su composición es > 98% hidratos de carbono, < 0,5% proteína y < 2% ceniza. El mismo se presenta como un polvo de escamas de color blanco. Es inodoro, con sabor suave característico.
- La goma arábica (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos), se presenta en polvo y es de color blanco.
- La maltodextrina (maltodextrina de maíz “MALTRINA 15”, Glutal S.A. Esperanza, Argentina) en su composición tiene 13-17% dextrosa (base seca), <10% humedad y < 0,5% de ceniza. Se presenta como un polvo blanco, totalmente soluble, de sabor dulce.
- El permeado de suero (Variolac® 850, Arla Foods), en su composición tiene  $\leq$  3% proteína,  $\geq$  85% lactosa,  $\leq$  7% cenizas. Se presenta como un polvo de color blanco.

#### **3.1.2. Evaluación de las características físicas de los materiales de pared individuales**

Se utilizó gelatina, almidón de maíz pregelificado y goma arábica como potenciales materiales para la matriz de las macrocápsulas. Se realizó una evaluación individual de los materiales para evaluar sus características físicas. Para dicha caracterización, se realizaron preparaciones en cinco concentraciones diferentes de cada material por separado: 1%, 5%, 10%, 15% y 20% p/v en agua destilada a temperatura ambiente (Tabla 3). Cada preparación fue mezclada hasta homogeneización completa en agitador magnético (MSH-300N, Boeco, Alemania). Luego de la preparación, las soluciones fueron dispensadas en placas de Petri de vidrio y se evaluaron las características físicas de los materiales. La misma se realizó en dos



tiempos, al momento en que las soluciones fueron dispensadas en las placas, tiempo cero ( $t=0h$ ) y luego de 4 horas de formadas las soluciones ( $t=4h$ ). Para la evaluación en  $t=4h$ , las soluciones fueron mantenidas a temperatura ambiente hasta el momento de su caracterización. Las características de las soluciones que se evaluaron fueron consistencia, adherencia al soporte y separación de fases.

#### Consistencia:

Para ello, cuatro niveles fueron definidos según la manera en que reaccionaban ante la aplicación de un esfuerzo aplicado con cuchara: líquida, semilíquida, semisólida y sólida.

- Líquida: aquellas soluciones, las cuales, al levantar con una cuchara, fluían ligeramente.
- Semilíquida: aquellas soluciones que al levantar con una cuchara fluían con menor velocidad de movimiento.
- Semisólida: aquellas soluciones con baja fluidez y tendencia a adherirse a la cuchara.
- Sólida: aquellas soluciones que permanecían adheridas a la cuchara, adquiriendo una forma definida.

#### Adherencia al soporte

Fue evaluada utilizando una clasificación categórica. Para ello, dos niveles fueron definidos según la adherencia a placas de Petri de vidrio: con adherencia al soporte y sin adherencia al soporte.

- Con adherencia al soporte: aquellas soluciones que presentaban resistencia a la separación de la placa de Petri.
- Sin adherencia al soporte: aquellas soluciones que no presentaban resistencia a la separación de la placa de Petri.

#### Separación de fases

Fue evaluada utilizando una clasificación categórica. Para ello, dos niveles fueron definidos según la homogeneidad que presentaba la solución evaluada visualmente: con separación de fases y sin separación de las fases.

- Con separación de fases: aquellas soluciones cuyos componentes sólidos sedimentaban formando 2 fases, una sólida y una líquida.
- Sin separación de fases: aquellas soluciones cuyos componentes forman una solución homogénea.

**Tabla 3.** Soluciones evaluadas individualmente en sus características físicas para ser utilizadas como materiales de pared para la matriz de las macrocápsulas.

Concentraciones de los materiales	Denominación
Almidón 1% p/v	A1
Almidón 5% p/v	A5
Almidón 10% p/v	A10
Almidón 15% p/v	A15
Almidón 20% p/v	A20
Goma Arábica 1% p/v	Ga1
Goma Arábica 5% p/v	Ga5
Goma Arábica 10% p/v	Ga10
Goma Arábica 15% p/v	Ga15
Goma Arábica 20% p/v	Ga20
Gelatina 1% p/v	G1
Gelatina 5% p/v	G5
Gelatina 10% p/v	G10
Gelatina 15% p/v	G15
Gelatina 20% p/v	G20

### 3.1.3. Evaluación de los materiales de pared combinados

Se evaluaron preparaciones de mezclas de almidón, goma arábica y gelatina. Se realizaron todas las combinaciones posibles de los tres materiales, utilizando 2 materiales por vez, siempre en proporciones iguales de cada material. Las concentraciones finales de las mezclas fueron 5% p/v (2,5% p/v de cada material), 10% p/v (5% p/v de cada material), 15% p/v (7,5% p/v de cada material) y 20% p/v (10% p/v de cada material). Para las combinaciones de 3 materiales, se utilizaron concentraciones finales de 10% p/v (3,3% p/v de cada material), 15% p/v (5% p/v de cada material) y 20% p/v (6,6% p/v de cada material), siempre en proporciones iguales (Tabla 4). Los materiales fueron pesados por separado y luego se le adicionó el agua destilada. Cada preparación fue mezclada hasta homogeneización completa en agitador magnético (MSH-300N, Boeco, Alemania). Luego de preparadas las mezclas, fueron colocaron en placas de Petri y se evaluaron las características físicas de las mezclas en 2 tiempos, recién formadas ( $t=0$ ) y luego de 4 h ( $t= 4h$ ) según los parámetros descriptos en el apartado 3.1.2.

Además se utilizó una técnica de preparación de películas comestibles que utiliza como materiales gelatina y almidón en las proporciones usadas por Fakhouri *et. al* (2015). Para esto, la gelatina se preparó al 10% p/v en agua destilada y luego fue calentada a 70°C por 10 minutos. La solución de almidón se preparó al 5% p/v en agua destilada y luego se calentó a

70°C por 10 minutos. Cada preparación fue mezclada hasta homogeneización completa en agitador magnético (MSH-300N, Boeco Germany). Luego las soluciones de gelatina-almidón (G:A) fueron mezcladas en tres proporciones diferentes: cuatro partes de gelatina en una de almidón (4:1), con una concentración final 9% p/v (8% p/v gelatina y 1% p/v de almidón) (G:A9); una parte de gelatina en una de almidón (1:1) con concentración final de 7,5% p/v (5% p/v gelatina y 2,5% p/v almidón) (G:A7,5) y una parte de gelatina en cuatro de almidón (1:4) con concentración final de 6% p/v (4% p/v almidón y 2% p/v gelatina) (G:A6). Las mismas fueron colocadas en placas de Petri y se procedió con una evaluación de las características físicas de las mezclas a t=0 y t= 4h según lo descrito en la sección 3.1.2.

**Tabla 4.** Soluciones combinadas evaluadas en sus características físicas para ser utilizadas como materiales de pared para la matriz de las macrocápsulas.

Concentraciones de los materiales	Denominación
5 % p/v concentración final	
Gelatina + Goma arábica	G:Ga5
Gelatina + Almidón	G:A5
Almidón + Goma arábica	A:Ga5
10% p/v concentración final	
Gelatina + Goma arábica	G:Ga10
Gelatina + Almidón	G:A10
Almidón + Goma arábica	A:Ga10
Gelatina + Almidón + Goma arábica	G:A:Ga10
15% p/v concentración final	
Gelatina + Goma arábica	G:Ga15
Gelatina + Almidón	G:A15
Almidón + Goma arábica	A:Ga15
Gelatina + Almidón + Goma arábica	G:A:Ga15
20% p/v concentración final	
Gelatina + Goma arábica	G:Ga20
Gelatina + Almidón	G:A20
Almidón + Goma arábica	A:Ga20
Gelatina + Almidón + Goma arábica	G:A:Ga20
Metodología utilizada por Fakhouri <i>et al.</i> (2015)	
Gelatina + Almidón	G:A9
Gelatina + Almidón	G:A7,5
Gelatina + Almidón	G:A6

### 3.1.4. Evaluación de diferentes métodos de secado de las matrices

Tres matrices compuestas por gelatina y almidón fueron analizadas en cuanto a sus características físicas luego de la aplicación de diferentes métodos de secado. Se evaluaron las matrices G:A6, G:A7,5 y G:A20 en tres condiciones diferentes de secado: secado en temperatura ambiente, secado en estufa y secado por liofilización. La metodología para la preparación de las 3 matrices fue descrita en el apartado 3.1.3. Una vez preparadas, las mezclas fueron colocadas en placas de Petri.

Para el secado a temperatura ambiente, las placas de Petri fueron dispuestas a  $25 \pm 2$  °C. El secado en estufa se realizó a  $37 \pm 2$  °C en estufa Biolec RE 3.1 (Bioelec, Santa Fe, Argentina). Para el secado mediante liofilización, las matrices fueron congeladas a  $-80$  °C durante 18 h y

luego se liofilizaron a 0,044 mbar durante 18 h en un equipo Alpha 1-4 LD PLUS (Christ, Osterode am Harz, Alemania). El tiempo óptimo de secado, se determinó como aquel en el cual el peso de las matrices comenzó a ser constante (Turker y Hamamci, 1998). Luego de completado el proceso de secado, se continuó con el análisis de las características físicas de las matrices

Las características de las matrices que se evaluaron fueron cambios de estructura y color, adherencia al soporte y separación de fases.

#### Cambios de estructura

Fue evaluada utilizando una clasificación categórica. Para ello, dos niveles fueron definidos mediante observación visual: con encogimiento y sin encogimiento.

- Con encogimiento: las matrices secas presentaban un tamaño menor en comparación con la matriz antes del secado.
- Sin encogimiento: las matrices secas presentaban el mismo tamaño que la matriz antes del secado.

#### Cambios de color

Fue evaluada utilizando una clasificación categórica. Para ello, dos niveles fueron definidos mediante observación visual: con cambio de color y sin cambio de color.

- Con cambio de color: las matrices secas presentaban un color más oscuro en comparación con la matriz antes del secado.
- Sin cambio de color: las matrices secas presentaban un color más oscuro en comparación con la matriz antes del secado.

#### Adherencia al soporte

Fue evaluada utilizando una clasificación categórica. Para ello, dos niveles fueron definidos según la adherencia a placas de Petri de vidrio: con adherencia al soporte y sin adherencia al soporte.

- Con adherencia al soporte: aquellas matrices que presentaban resistencia a la separación de la placa de Petri.
- Sin adherencia al soporte: aquellas matrices que no presentaban resistencia a la separación de la placa de Petri.

### Separación de fases

Fue evaluada utilizando una clasificación categórica. Para ello, dos niveles fueron definidos según la homogeneidad que presentaba la solución evaluada visualmente: con separación de fases y sin separación de las fases.

- Con separación de fases: aquellas matrices cuyos componentes sólidos no mantenían una mezcla homogénea.
- Sin separación de fases: aquellas matrices cuyos componentes sólidos formaban una mezcla homogénea.

Además se calculó el porcentaje de pérdida de agua en concentración porcentual en las tres condiciones de secado según la siguiente fórmula:

$$\frac{(P_u - P_s)}{P_m} \times 100 = \text{porcentaje de pérdida de agua (\%m/m)}$$

Siendo:

P<sub>m</sub>: peso de la muestra húmeda (g)

P<sub>u</sub>: peso de la placa de Petri conteniendo la muestra antes del secado (g)

P<sub>s</sub>: peso la placa de Petri conteniendo la muestra luego del secado (g).

(Farmacopea Mercosur: Método General Para La Determinación De Pérdida Por Secado, MERCOSUR/XLII SGT N° 11/P.RES.14).

## **3.2. Entrampamiento de *L. reuteri* DSPV002C**

Este estudio fue realizado para evaluar el efecto del entrampamiento de los microorganismos en diferentes matrices, con el agregado de crioprotectores y sometidos a diferentes métodos de secado sobre la viabilidad de las bacterias.

### **3.2.1. Evaluación de diferentes métodos de secado de *L. reuteri* DSPV002C en diferentes matrices**

#### **3.2.1.1. Microorganismo**

La cepa *L. reuteri* DSPV 002C (Genbank number: GQ231436), es un microorganismo aislado desde el íleon porcino, perteneciente al cepario del Departamento de Salud Pública Veterinaria (DSPV) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL. En estudios *in vitro*

realizados por Bertozzi (2012), la cepa mostró capacidades de autoagregación y coagregación frente a *Salmonella dublin* 597T y *Escherichia coli* 247T. Mediante la producción de sustancias inhibitorias (ácidos y bacteriocinas), causó diferentes grados de inhibición frente a *Salmonella dublin* 597T, *Salmonella typhimurium* 542T, *Salmonella dublin* 559T (Bertozzi, 2012), así como también de 4 cepas de *Campylobacter* termotolerantes (Zimmermann *et al.*, 2017). Esta cepa mostro también tolerancia en diferentes concentraciones de bilis (1% - 7%), así como crecimiento en pH 4. En estudios *in vivo* moduló la microbiota del TGI, así como también mejoró el status sanitario y productivo de los animales (Fusari *et al.*, 2016a; 2017).

### **3.2.1.2. Condiciones de cultivo**

Para la producción de biomasa se realizó un cultivo de la cepa *L. reuteri* en caldo MRS (De Man *et al.*, 1960) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) a 37°C durante 18 hs y luego un pasaje en el mismo medio y en las mismas condiciones. A partir del segundo caldo de MRS se inocularon 80 ml (2% v/v) en un medio a base de subproductos de la industria láctea, diseñado especialmente para el crecimiento óptimo de *L. reuteri* DSPV002C (Fusari *et al.*, 2013). El medio estaba compuesto por: 4 l de permeado de suero (PS) (VARIOLAC 850, Arla Foods, Porteña, Argentina) (60 g/l) suplementado con 0,003g/l de sulfato de manganeso monohidratado (MnSO<sub>4</sub>) (Merck, Darmstadt, Alemania); 8g/l de extracto de levadura (Biokar Diagnostics); 10g/l de peptona de caseína (Microkin S.R.L., Santa Fe, Argentina) y 20g/l de dextrosa (Cicarelli, Argentina). La fermentación fue realizada en un biorreactor BIOSTAT® A (Sartorius Stedim Biotech, mod. BB-8822000, Francia ) a 37 °C, en agitación continua (120 rpm) en anaerobiosis y pH constante de 6,0 ±0,2 por titulación automática con una solución estéril de hidróxido de sodio 6 N durante 18 h. Finalizada la producción de biomasa, se evaluó la concentración del cultivo mediante recuento en placa de medio MRS agar (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) a partir de diluciones decimales en solución Ringer ¼ (Biokar, Beauvais, Francia). Se retiró la totalidad del cultivo del fermentador y se centrifugó (Thermo Scientific™ Sorvall™ RC 6 Plus, Estados Unidos) a 17°C durante 10 min a 5000 g. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en tampón fosfato salino (PBS) (NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM) para lavar las células. Este procedimiento se repitió dos veces consecutivas.

### **3.2.1.3. Entrampamiento del inóculo en diferentes matrices**

Las matrices utilizadas fueron G:A7,5 y G:A20 cuyo protocolo de producción está descrito en la sección 3.1.3. Ambas matrices fueron sometidas a un tratamiento térmico a 90°C durante 15 minutos. El cultivo concentrado fue mezclado con las matrices G:A7,5 y G:A20 en proporción 1:1 (G:A7,5 1:1 y G:A20 1:1, respectivamente) y dispensados en placas de Petri.

Se tomaron muestras de las mezclas y se realizaron siembra en placa de MRS mediante diluciones seriadas en Ringer  $\frac{1}{4}$  para determinar la concentración del inóculo en las matrices pre-secado.

#### **3.2.1.4. Condiciones de secado del inóculo en diferentes matrices**

Las diferentes matrices con el inóculo fueron sometidas a 3 condiciones de secado, como se describió en la sección 3.1.4. Finalizado el tiempo de secado, se realizaron recuentos en placa de MRS mediante diluciones decimales seriadas en solución Ringer  $\frac{1}{4}$  para determinar la viabilidad de *L. reuteri* DSPV002C post secado.

#### **3.2.1.5. Análisis estadístico**

El efecto de las condiciones de secado sobre la viabilidad del inóculo, se analizó mediante el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Se realizó un análisis factorial con 2 matrices (G:A7,5 y G:A20) x 3 secados (estufa, temperatura ambiente y liofillizado). También se realizó un test de t-student para comparar la viabilidad de las 2 matrices evaluadas previo al secado. Finalmente se realizó un ANOVA de 1 vía y test de Duncan para comparar la viabilidad de cada una de las matrices previamente al secado y luego del secado en las 3 condiciones. El nivel de significación estadístico fijado para todos los análisis fue de  $P < 0.05$ .

#### **3.2.2. Evaluación de la viabilidad de macrocápsulas liofilizadas con diferentes proporciones del inóculo:matriz y crioprotectores**

Las condiciones de cultivo para el crecimiento y producción de biomasa de *L. reuteri* DSPV002C fueron descriptas en el apartado 3.2.1.2. Las matrices utilizadas fueron G:A7,5 y G:A20, las preparaciones de estas fueron descriptas en el apartado 3.2.1.3.

En este estudio se evaluaron diferentes proporciones de inóculo:matriz y se incorporaron permeado o maltodextrina como crioprotectores. Para la formación de las macrocápsulas, se utilizaron moldes de silicona de un tamaño similar al del peletizado con el que se alimenta a los cerdos. Las macrocápsulas fueron liofilizadas en las condiciones descriptas en la sección 3.1.4. La viabilidad de *L. reuteri*, fue determinada pre-secado y post-secado para determinar el método de secado y la matriz óptimos para mantener las bacterias vivas.



### **3.2.2.1. Entrampamiento del inóculo en diferentes proporciones inóculo:matriz**

Luego de la preparación de las matrices G:A7,5 y G:A20, se procedió a realizar las mezclas con el inóculo. Las diferentes proporciones utilizadas, fueron: 1) 50% inóculo + 50% matriz (G:A 7,5 1:1 y G:A20 1:1); 2) 66,6% inóculo + 33,3% matriz (G:A 7,5 2:1 y G:A20 2:1); 3) 75% inóculo + 25% matriz (G:A 7,5 3:1 y G:A20 3:1); 4) 83,3% inóculo + 16,6% matriz (G:A 7,5 5:1 y G:A20 5:1) y 5) 90% inóculo + 10% matriz (G:A 7,5 9:1 y G:A20 9:1).

### **3.2.2.2. Incorporación de crioprotectores.**

Luego de la preparación de las mezclas de inóculo + matriz, se adicionó a las mismas, maltodextrina al 10% p/v (maltodextrina de maíz "MALTRINA 15", Glutal S.A. Esperanza, Argentina) o PS (Variolac® 850, Arla Foods) al 10% p/v concentración final y fueron mezcladas en agitador magnético hasta completa homogeneización.

En la tabla 5 se presenta la nomenclatura utilizada para las diferentes combinaciones de inóculo:matriz con los crioprotectores.

**Tabla 5.** Nomenclaturas utilizadas para la denominación de las diferentes proporciones de inóculo:matriz con los crioprotectores.

Proporción Inóculo:matriz	Crioprotector	Denominación
<b>Matriz G:A7,5</b>		
1:1	Permeado de suero	G:A7,5PS 1:1
2:1		G:A7,5PS 2:1
3:1		G:A7,5PS 3:1
5:1		G:A7,5PS 5:1
9:1		G:A7,5PS 9:1
1:1	Maltodextrina	G:A7,5M 1:1
2:1		G:A7,5M 2:1
3:1		G:A7,5M 3:1
5:1		G:A7,5M 5:1
9:1		G:A7,5M 9:1
<b>Matriz G:A20</b>		
1:1	Permeado de suero	G:A20PS 1:1
2:1		G:A20PS 2:1
3:1		G:A20PS 3:1
5:1		G:A20PS 5:1
9:1		G:A20PS 9:1
1:1	Maltodextrina	G:A20M 1:1
2:1		G:A20M 2:1
3:1		G:A20M 3:1
5:1		G:A20M 5:1
9:1		G:A20M 9:1

**3.2.2.3. Formación de cápsulas y liofilización.**

Las diferentes mezclas, fueron colocadas en jeringas de 30 ml y dispensadas mediante extrusión en moldes de silicona con forma esférica de 10 mm de diámetro para la formación de las macrocápsulas. Luego, los moldes fueron colocados a -80°C durante 18 h y se liofilizaron a 0,044 mbar en un equipo Alpha 1-4 LD PLUS durante 18 h.

**3.2.1.4 Determinación de la viabilidad bacteriana.**

Para determinar la viabilidad de los microorganismos luego del secado de las macrocápsulas, se realizaron recuentos en placa de MRS mediante diluciones decimales seriadas en solución Ringer ¼. Las macrocápsulas fueron pesadas previo al secado y luego del mismo. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado

### **3.2.1.5 Análisis estadístico.**

Los datos de viabilidad se analizaron mediante el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) con un análisis factorial completo 2 (matrices) x 5 (proporciones diferentes) x 2 (crioprotectores). Además, se realizó un ANOVA de 1 vía y test de Duncan para comparar la viabilidad entre macrocápsulas con la misma matriz y diferentes proporciones de inóculo:matriz.

## **3.3. Determinación de la viabilidad bacteriana dentro de las macrocápsulas a través del tiempo**

La cepa probiótica utilizada y las condiciones de cultivo para el crecimiento y producción de biomasa fueron descritas en el apartado 3.2.1.1 y 3.2.1.2 respectivamente. Las macrocápsulas utilizadas fueron G:A7,5PS 9:1; G:A20PS 9:1; G:A7,5M 9:1 y G:A20M 9:1 liofilizadas según se describe en la sección 3.2.1.4. La metodología de entrapamiento fue descrita en el apartado 3.2.2.1 y la incorporación de los CP se describe en el apartado 3.2.2.2.

### **3.3.1. Diseño del experimento**

Las macrocápsulas recién formadas se colocaron en recipientes de vidrio color ámbar y se dividieron en 2 grupos, envasadas con atmósfera modificada (envasadas al vacío) y atmósfera no modificada (envasadas sin vacío). El vacío de los recipientes de vidrio se realizó a 0,065 mbar y fue generado en un equipo Alpha 1-4 LD PLUS (Christ, Osterode am Harz, Alemania). A su vez, las macrocápsulas fueron almacenadas en 3 condiciones de temperatura diferentes: temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C), refrigeración (4 °C) y congelación (-20 °C). Se realizó la evaluación de la viabilidad de las macrocápsulas a tiempo 0, 35, 70, 105, 140, 175 y 210 días a través de diluciones seriadas en solución Ringer  $\frac{1}{4}$  y recuentos en placa de MRS. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

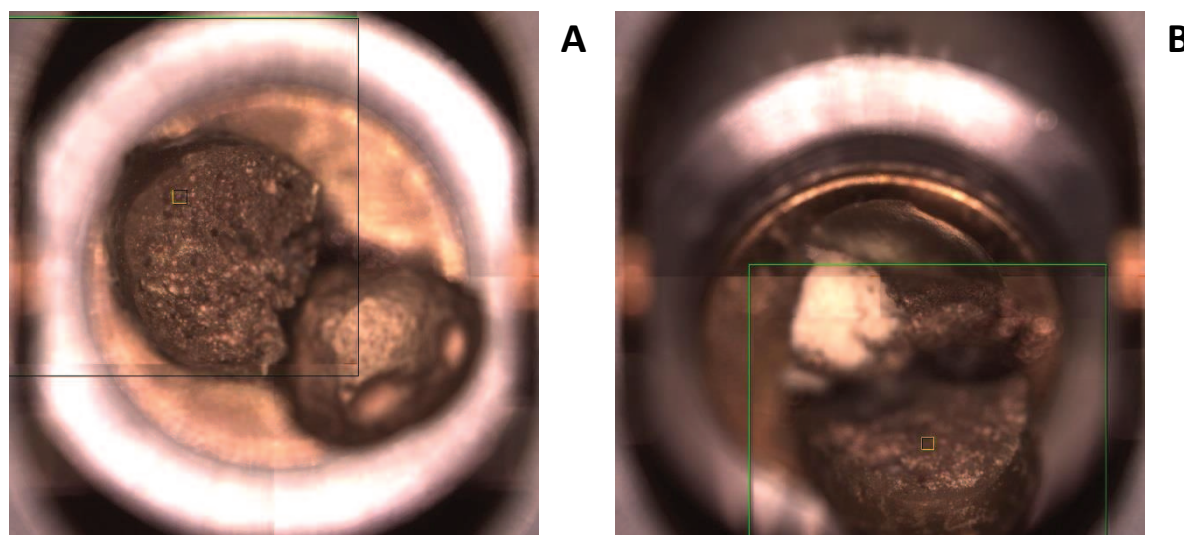
### **3.3.2. Obtención de imágenes de macrocápsulas mediante microscopía electrónica de barrido**

Este estudio se realizó con el objetivo de caracterizar la estructura interna y externa de las macrocápsulas, así como también la interacción entre los microorganismos y la matriz de la misma mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Para la toma de las imágenes, se utilizaron las macrocápsulas G:A7,5PS 9:1 y G:A20PS 9:1.

### 3.3.2.1. Adquisición de imágenes

Para la obtención de las imágenes se realizaron cortes en diferentes ángulos de las macrocápsulas. Los cortes, fueron fijados al soporte portamuestras mediante cinta adhesiva de grafito. Después se realizó un recubrimiento de las muestras (sputtering) con una película de Oro (Au, 99.9 %, Emitech) en un equipo Sputter coater Emitech modelo K500X (UK) con un voltaje de 2 kV y corriente de 40 mA. El tiempo total de sputtering fue de 4 minutos (Figura 2). Luego se procedió a la obtención de imágenes con un microscopio Phenom ProX Desktop SEM (Phenom-World, Eindhoven, Países Bajos). Las imágenes obtenidas fueron de electrones retrodispersados (backscattered electrons) con un voltaje de operación de 15 kV. El software predeterminado de Phenom-World capturó imágenes con aumentos de 500X, 600X, 3000X, 7500X, 8000X, 14000X y 15000X.

**Figura 2.** Cortes de macrocápsulas G:A7,5PS 9:1 y G:A20PS 9:1 con recubrimiento en oro (sputtering) preparadas para observación en microscopía electrónica de barrido.



Cortes montados en portamuestras. **A.** Macrocápsula G:A7,5PS 9:1: compuesta por gelatina 5% p/v + almidón 2,5% p/v con permeado de suero 10% como CP y liofilizadas. **B.** Macrocápsula G:A20PS 9:1: compuesta por gelatina 10% p/v + almidón 10% p/v con permeado de suero 10% p/v como CP y liofilizadas.

### 3.3.3. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). La viabilidad bacteriana dentro de las macrocápsulas fue evaluada mediante un diseño factorial de 2 (matrices) x 2 (crioprotectores) x 2 (envasado) x 3 (temperatura) y se analizó mediante ANOVA factorial de medidas repetidas y test de Duncan con una significación de  $P < 0,05$ .

### **3.4. Evaluación de la viabilidad de *L. reuteri* DSPV002C encapsulada en condiciones gastrointestinales simuladas**

#### **3.4.1. Producción de macrocápsulas**

La producción de biomasa fue realizada como se describió en el apartado 3.2.1.2. Se produjeron las macrocápsulas G:A7,5PS 9:1 liofilizadas como se detalla en los apartados 3.2.2.1., 3.2.2.2. y 3.2.1.4. Las macrocápsulas fueron conservadas durante 2 semanas en congelación y envasadas al vacío, previo a su utilización en el ensayo.

#### **3.4.2. Producción de cultivo libre**

Para los microorganismos libres, se realizó un cultivo fresco de la cepa *L. reuteri* DSPV002C en MRS a 37 °C durante 18 h y 2 pasajes de la misma manera. Luego del tiempo de incubación, la cepa se recogió por centrifugación (3500 rpm durante 5 min) y se lavó dos veces con Ringer ¼.

#### **3.4.3. Preparación de soluciones gastrointestinales simuladas**

La solución de jugo gástrico (JG) se preparó mediante la suspensión de pepsina (Riedel-de Hën, Seelze, Alemania) en una solución estéril de cloruro de sodio (NaCl) 0,2% p/v a una concentración final de 0,35% p/v con ajuste de pH a  $3,0 \pm 0,2$  con ácido clorhídrico (HCl) (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe – Argentina). La solución fue esterilizada con filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Wang *et al.*, 2011).

Para la preparación de la solución de jugo intestinal (JI) se utilizó una solución estéril de NaCl al 1,1% p/v con 0,2% p/v de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) a la que se agregó tripsina al 0,1% p/v (Gibco® Thermo Fisher Scientific. Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) y sales biliares al 1,8% p/v (Britania, Buenos Aires, Argentina). El pH se ajustó a  $8,0 \pm 0,2$  con NaOH estéril (Cicarelli, San Lorenzo - Santa Fe – Argentina). La solución fue esterilizada con filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Wang *et al.*, 2011).

#### **3.4.4. Diseño del experimento**

El ensayo se realizó con el método descrito por Wang *et al.* (2011) con algunas adaptaciones. Tres macrocápsulas G:A7,5PS 9:1 y 1 ml de cultivo libre fueron incubadas en tubos falcon con 9 ml de JG (pH =  $3 \pm 0,2$ ) a 37°C en agitación continua durante 3 h para simular peristalsis (Shaker Mini Rocker MR-1, Boeco, Alemania). Luego de las 3 h, la muestra fue centrifugada

(3500 rpm durante 5 min), el sobrenadante descartado y el sedimento resuspendido en 9 ml de la solución de JI. Los tubos fueron incubados nuevamente durante 3 h a 37 °C en agitación continua. Luego, la muestra fue centrifugada (3500 rpm durante 5 minutos), el JI descartado y el sedimento resuspendido en 9 ml de solución Ringer 1/4. La viabilidad de las cepa libre y encapsulada fue medida cada 1,5 h mediante recuento en placas y citometría de flujo. El ensayo fue realizado por triplicado.

A partir de las diferencias en los recuentos entre el inicio del experimento y los diferentes tiempos, se calculó la pérdida de viabilidad:

UFC t0 - UFC t1 = Pérdida de viabilidad

Donde UFC= Unidades formadoras de colonias; t0= tiempo 0 y t1 = diferentes tiempos de incubación (1,5 h; 3 h; 4,5 h; 6 h).

Además, se calculó el porcentaje de supervivencia mediante la siguiente formula:

$$\frac{(\text{UFC } t1 * 100)}{\text{UFC } t0} = \text{porcentaje de supervivencia}$$

Donde UFC= Unidades formadoras de colonias; t0= tiempo 0 y t1= diferentes tiempos de incubación (1,5 h; 3 h; 4,5 h; 6 h).

#### **3.4.5. Determinación de la viabilidad bacteriana mediante recuento en placas**

La viabilidad bacteriana fue evaluada al inicio del experimento y cada 1,5 h hasta finalizar el ensayo, mediante recuento en placa. En cada tiempo de evaluación de las cápsulas y el cultivo libre, se descartó el JG o JI mediante centrifugación a 4500 r.p.m. durante 5 min. Luego, los sedimentos de ambos tipos de muestras fueron resuspendidos en solución Ringer 1/4. En el caso de macrocápsulas suspendidas en Ringer 1/4, las mismas fueron agitadas mediante vortex (V1 Plus, Boeco, Alemania) hasta su completa disgregación. Se realizaron diluciones decimales seriadas en Ringer 1/4 de las macrocápsulas y del cultivo libre. Posteriormente, se sembraron en placas con agar MRS (Biokar, Beauvais, Francia) y se incubaron a 37°C por 72 h en anaerobiosis.

#### **3.4.6. Determinación de la viabilidad bacteriana mediante citometría de flujo**

La viabilidad bacteriana mediante citometría de flujo, fue evaluada al inicio del experimento y cada 1,5 h hasta finalizar el ensayo. Para esto, las soluciones con los microorganismos del cultivo libre y de las macrocápsulas fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 5 min y lavadas

2 veces con NaCl 0,85% p/v y luego se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml. Posteriormente, se realizó la tinción de las mismas, utilizando los fluorocromos SYTO9 e Ioduro de propidio (IP) (Kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability, Molecular Probes, Estados Unidos) según recomendaciones del fabricante. Para ello, se preparó una solución de los fluorocromos conteniendo 1  $\mu$ l de SYTO9 (3,34 mM) y 0,5  $\mu$ l de IP (20 mM) en 100  $\mu$ l de NaCl 0,85% p/v y se colocaron 20  $\mu$ l en cada inóculo bacteriano. Luego, las muestras se incubaron en oscuridad durante 15 min. Finalmente, las células fueron adquiridas con un citómetro de flujo Attune NxT (Acoustic Focusing Cytometer A24860, Thermo Fisher SCIENTIFIC). Los datos obtenidos fueron analizados utilizando un software específico (FlowJo, TreeStar Inc., Ashland, EE. UU). La curva de calibración utilizada se realizó preparando suspensiones bacterianas de microorganismos en proporciones vivas:muertas 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100. Las soluciones fueron ajustadas a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml y teñidas con los colorantes descriptos anteriormente.

A partir de las diferencias en los porcentajes de células vivas entre el inicio del experimento y los diferentes tiempos, se calculó la pérdida de viabilidad:

$$\% \text{ de células vivas } t_0 - \% \text{ de células vivas } t_1 = \text{Pérdida de viabilidad (\%)}$$

$t_0$  = tiempo 0 y  $t_1$  = diferentes tiempos de incubación (1,5 h; 3 h; 4,5 h; 6 h).

### **3.4.7. Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados mediante el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). La diferencia en la pérdida de viabilidad bacteriana entre las macrocápsulas y el cultivo libre se analizó utilizando un ANOVA para medidas repetidas. Para las comparaciones entre grupos en un momento específico del ensayo se utilizó ANOVA de una vía. Además, se realizó un ANOVA de una vía con test de Duncan (tomando  $P < 0,05$  como diferencia significativa) para evaluar diferencias entre los tiempos en un mismo grupo.

## **3.5. Determinación de la viabilidad bacteriana en las macrocápsulas adicionadas al alimento peletizado**

Con el objetivo de determinar la viabilidad del inóculo encapsulado adicionado al alimento transportador, se realizó un estudio de viabilidad en el tiempo de las macrocápsulas adicionadas al alimento de los cerdos y mantenidas en las condiciones de almacenamiento de este. Las macrocápsulas utilizadas fueron G:A7,5PS 9:1. La cepa probiótica utilizada fue

descrita en el apartado 3.2.1.1. La preparación de matriz, mezcla con microorganismos e incorporación de CP fueron descritas en los apartados 3.2.2.1. y 3.2.2.2. respectivamente. Finalmente, las macrocápsulas fueron liofilizadas como se explica en el apartado 3.2.1.4.

### 3.5.1. Diseño del experimento

Para este estudio, se utilizaron 2 alimentos peletizados de diferentes marcas comerciales, sin el agregado de antibióticos, destinados a cerdos de recría, cuyas composiciones se describen en la tabla 6. El alimento fue colocado en recipientes de vidrio color ámbar junto con las macrocápsulas recién formadas (1 macrocápsula/3 g de alimento) y se dividieron en 2 grupos, envasadas con atmósfera modificada (al vacío) a 0,065 mbar generada en un equipo Alpha 1-4 LD PLUS (Christ, Osterode am Harz Alemania) y atmósfera no modificada (sin vacío). Los recipientes fueron almacenados a temperatura ambiente (25 °C). Se realizó la evaluación de la viabilidad de las macrocápsulas a tiempo 0, 15, 30, 45 y 60 días a través de diluciones seriadas en solución Ringer ¼ y recuentos en placa de MRS. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Teniendo en cuenta que el consumo de alimento en lechones en etapa de recría es de al menos 0,5 kg de alimento/lechón/día, se calculó el número de macrocápsulas necesarias cada 0,5 kg de alimento (ración por lechón) y en la bolsa de 25 kg de alimento, en cada uno de los alimentos evaluados y en las distintas condiciones de almacenamiento, para asegurar la administración de al menos 10<sup>8</sup> UFC/d.

**Tabla 6.** Composición de los alimentos de recría utilizados en el ensayo.

Componente	Alimento 1	Alimento 2
Maíz	66,50%	63%
Expeller de soja	31%	32%
Mix	2,50%	5%

Mix del alimento 1: Calcio, fósforo, cloro, hierro, zinc, cobre, iodo, selenio, manganeso y Vitaminas (A, D, E, B2, B3 y Colina). Mix del alimento 2: Calcio, fósforo, cloro, hierro, Zinc, Cobre, iodo, cobalto y Vitaminas (A, D, E, K y Complejo B).

### 3.5.2. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina La viabilidad bacteriana dentro de las



macrocápsulas en las distintas condiciones estudiadas fue evaluada mediante un ANOVA factorial de medidas repetidas, con el siguiente diseño: 2 (alimentos) x 2 (atmósferas).

### 3.6. Evaluación de los efectos probióticos del inóculo encapsulado en cerdos.

Para verificar la eficiencia del método de conservación y administración del inóculo *L. reuteri* DSPV 002C se realizó un ensayo *in vivo* con lechones. En este se realizaron determinaciones de diferentes variables para determinar el efecto del tratamiento probiótico. El ensayo fue realizado en una granja experimental emplazada en las instalaciones de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Pergamino (Av. Frondizi Km 4,5 Centro Regional Buenos Aires Norte, B2700 Pergamino, Buenos Aires). La estación se encuentra ubicada a 33° 56' de Latitud Sur y 60° 33' de Longitud Oeste a 5 km al sur de Pergamino y 226 Km al NO de la ciudad de Buenos Aires (Figura 3).

**Figura 3.** Imagen satelital de la ubicación de la EEA INTA Pergamino

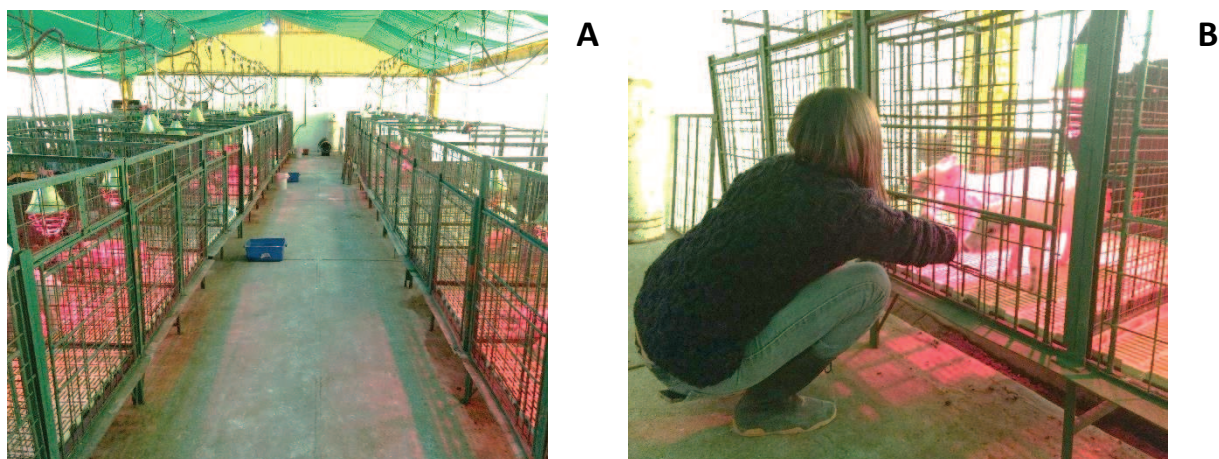


#### 3.6.1 Animales e instalaciones

Se utilizaron 20 lechones de ambos sexos, de genética Agrocercos PIC (*Sus scrofa domesticus*) destetados a los 28±1 d de vida. El día del destete, los lechones fueron seleccionados al azar de las camadas de 4 cerdas. Los mismos fueron trasladados a la granja experimental de 10 m de ancho x 20 m de largo x 3 m de alto, equipada con corrales jaula de

0,76 m x 1,26 m (Figura 4). Cada corral estaba equipado con un comedero, 1 chupetes para agua y piso de plástico slats. La temperatura de la sala fue regulada a  $24\pm 3$  °C mediante un sistema de calefacción/ventilación integrado por 1 lámpara infrarroja por jaula, 2 cañones a gas y mediante el empleo de cortinas.

**Figura 4.** Instalaciones y alojamiento de animales en EEA Pergamino INTA.



**A.** Sala Experimental. **B.** Alojamiento de lechones en jaulas.

### 3.6.2 Dieta

Los animales de ambos grupos experimentales fueron alimentados con concentrado comercial y recibieron agua *ad libitum* a lo largo de todo el experimento. La dieta fue realizada con el programa para lechones Magnum (TEKNAL nutrición animal) con Magnum Starter sin antibióticos para lechones a partir de los  $28\pm 1$  d hasta los  $35\pm 1$  d, luego Magnum Iniciador 300 en fase 3 hasta los  $45\pm 1$  d, y Magnum Recría 50 en fase 4 hasta los 70 d.

Magnum Starter y Magnum iniciador estaban compuestos por ingredientes de origen vegetal (harina de soja, soja extrusada, maíz extrusado, arroz y azúcar), de origen animal (leche entera, concentrado de proteínas de suero, suero de queso, harina de pescado y plasma bovino), minerales (carbonato de calcio, cloruro de sodio, fosfato monodivalente, óxido manganeso, sulfato de hierro, sulfato de zinc, cobre tribásico, selenito de sodio, carbonato de cobalto y iodato de calcio), vitaminas (A, D3, E, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, BH, K3) y aminoácidos (lisina, treonina, triptófano, metionina y valina).

Magnum recría estaba compuesto por harina de pescado y los mismos minerales, vitaminas y aminoácidos que los otros alimentos. La composición centesimal en base seca de los diferentes alimentos, se presentan en la tabla 7.

**Tabla 7.** Composición Centesimal (Base seca) de los alimentos utilizados en el ensayo.

Dietas	Starter	Iniciador	Recría
Proteína bruta % (mín.)	20	30	31
Extracto etéreo % (mín.)	5,5	12	No especifica
Fibra cruda % (máx.)	2,5	2	0,5
Calcio % (máx.-mín.)	0,5 - 0,4	2,2 - 2	9 - 8,4
Fósforo % (máx.-mín.)	0,62 - 0,58	1,3 - 1	4,9 - 4,5
Humedad % (máx.)	11	8	3,5
Cenizas % (máx.)	4,5	10	40
Valor energético (energía metabolizable)	3500 kcal	No especifica	No especifica

### 3.6.3. Microorganismo, obtención de mutantes resistentes a rifampicina y encapsulación

Se utilizó la cepa *L. reuteri* DSPV002C resistente a rifampicina para su monitoreo en materia fecal (MF). La misma se obtuvo mediante cultivos seriales en medio MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), comenzando con una concentración de rifampicina de 0,1 µg/ml hasta una concentración de 100 µg/ml (Demecková *et al.*, 2002; Ehrmann *et al.*, 2002). A partir de un cultivo *overnight* del microorganismo, se sembraron placas de agar MRS con rifampicina y fueron incubadas durante 48 h a 37 °C. Luego, las cepas resistentes a rifampicina se propagaron en caldo MRS durante 24 h a 37 °C. Las macrocápsulas utilizadas fueron G:A7,5PS 9:1. La preparación de matriz, mezcla con microorganismos e incorporación de CP fueron descritas en los apartados 3.2.2.1. y 3.2.2.2. respectivamente. Finalmente, las macrocápsulas fueron liofilizadas como se explica en el apartado 3.2.1.4.

### 3.6.4. Diseño del experimento

Los lechones destetados fueron divididos al azar en 2 grupos (grupo probiótico= GP y grupo control= GC) conformados por 10 animales cada uno y se colocaron 2 animales por jaula. El diseño del experimento fue en bloques al azar. Se tomaron muestras de materia fecal de 6 lechones al azar del GP y 6 lechones del GC, los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 del ensayo. Además, muestras de sangre (5 ml) fueron obtenidas para el estudio de los metabolitos sanguíneos de los animales a partir del día del destete (0 d) y a los 7, 21, y 42 d de 4 lechones de GP y 4 lechones de GC seleccionados al azar.

Una vez finalizado el ensayo (42 d), se seleccionaron al azar 3 animales de GC y 3 animales de GP. Los cerdos fueron trasladados a un frigorífico de la localidad de San Andrés de Giles, provincia de Bs. As, ubicado a 34° 25' de Latitud Sur y 59° 28' de Longitud Oeste (Figura 5). en un horario apropiado para reducir al mínimo el estrés del transporte. Se realizó el sacrificio y la faena de los animales por personal del frigorífico habilitado por SENASA. Se tomaron muestras de los diferentes segmentos del intestino delgado de los cerdos: duodeno, yeyuno e íleon para el estudio de la histomorfometría intestinal.

**Figura 5.** Imagen satelital de la ubicación del frigorífico.



### 3.6.5. Administración del inóculo

Al GP se le administró diariamente el inóculo *L. reuteri* DSPV 002C individualmente a cada lechón, en forma de cápsula oral todas las mañanas en el mismo horario, asegurando una dosis igual o superior a 9,80 Log UFC/animal/d. La administración del inóculo se realizó desde el día 1 (28±1 d de vida) hasta el día 42 del ensayo. Los procedimientos utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral y por el CICUAE (Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación) de INTA CRBAN (Centro regional Buenos Aires norte).



### **3.6.6. Normas de bioseguridad**

Para evitar la contaminación del GC con la cepa probiótica, se utilizaron prácticas de manejo diseñadas para prevenir la entrada, transmisión y diseminación de la cepa. Para el ingreso y egreso del galpón se colocaron bandejas con cal para el calzado. Se utilizaron guantes y delantales descartables para el GP y el GC, así como también desinfección de manos con alcohol 70 en spray y del calzado en bandejas con cal entre los grupos. Además, se prohibió el ingreso a la granja experimental de visitas y personal ajeno al ensayo.

### **3.6.7. Toma de muestras de materia fecal para análisis microbiológicos y moleculares**

La técnica utilizada fue mediante masaje rectal o defecación espontánea. Las heces fueron recolectadas en bolsas plásticas y conservadas en refrigeración hasta su procesamiento en el laboratorio, dentro de las 6 h de obtenidas. Las muestras de materia fecal fueron utilizadas para evaluar las poblaciones microbianas mediante recuentos microbiológicos. Además, 0,2 g de muestras de MF de los d 0, 21 y 42, se almacenaron en 1,5 ml de solución buffer (PBS) a -20° C por duplicado para su posterior análisis mediante DGGE.

### **3.6.8. Análisis microbiológicos en muestras de materia fecal**

#### **3.6.8.1. Poblaciones microbianas**

A partir de las muestras de materia fecal se realizaron recuentos de poblaciones microbianas mediante diluciones decimales seriadas en Ringer ¼ (Biokar, Beauvais, Francia) y siembra en placas de Petri con medios específicos para el recuento de UFC. Para las bacterias ácido lácticas (BAL) se utilizó agar MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) el cual fue incubado a 37 °C en condiciones de anaerobiosis durante 72 h. Para *Escherichia coli* se utilizó agar TBX (Triptona-Bilis-X-glucurónido) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Las placas fueron incubadas a 44 °C durante 24 h en aerobiosis. Para levaduras se utilizó el medio Hongos y levaduras (HyL) (Britania, Buenos Aires, Argentina) suplementado con 20 g/l de dextrosa y 5 g/l de pluripeptona. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 48 h en aerobiosis. Para *Campylobacter* termotolerantes se utilizaron placas de agar modificado con carbón vegetal, cefoperazona y deoxicolato (mCCDA); las mismas fueron incubadas a 42 °C en condiciones de microaerofilia (85% de N<sub>2</sub>, 10% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>) durante 48 h. Las colonias presuntivas de *Campylobacter* termotolerantes fueron observadas al microscopio de contraste de fases, a partir de un fresco para su confirmación. Se realizó el monitoreo de la presencia de la cepa probiótica (recuento) sembrando en medio LAMVAB (Lactobacillus Anaerobic MRS con

Zimmermann JA, (2020)

vancomycina y verde de bromocresol) (Hartemink *et al.* 1997) con el agregado de rifampicina (100 µg/ml).

A partir de los recuentos de las diferentes poblaciones, se realizó el cálculo de la relación (a/b) entre los recuentos de las poblaciones de BAL, *E. coli*, *Campylobacter* spp. y levaduras.

### **3.6.8.2. Análisis de la dinámica poblacional de la microbiota predominante por DGGE**

Se utilizó la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, del inglés: “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”) para el análisis de la dinámica poblacional en la microbiota fecal de los lechones. La toma de muestras para DGGE fue descrita en el apartado 3.7.8.

#### **3.6.8.2.1 Extracción de ADN de las muestras de materia fecal**

La extracción de ADN de todas las muestras de materia fecal se realizó con un Kit comercial Wizard® Genomic Purification ADN Kit (Promega, Madison, Estados Unidos). La concentración de ADN obtenida en cada una de las muestras fue cuantificada y ajustada hasta alcanzar una concentración final de 25-50 nmoles/µL con equipo Take3 y software Gen5 para Windows versión 2.01 en un lector multimodal de microplacas (Sinergy HT, Bio-Tek, Winooski, Estados Unidos).

#### **3.6.8.2.2. Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se realizó la amplificación de la región codificante del gen 16S del ADNr utilizando el kit GoTaq DNA Polimerase (Promega, Vilnius, Lituania). Se utilizaron los primers específicos universales GC-HDA1 y HDA2 (Tabla 8) que amplifican la región V3 del gen del ADNr 16S (200 pb) (Li *et al.*, 2003). Se empleó un termociclador Touch Thermal Cycler T960 (Heal Force, Shanghai, China) con un programa de amplificación compuesto por una desnaturalización inicial de 4 min 30 s a 94 °C, seguida de una repetición de 35 ciclos que constaban de tres etapas: una de desnaturalización durante 30 s a 94°C, otra de hibridación de los primers durante 30 s a 58°C y otra de elongación durante 1 min a 68°C. Una vez completado el número de ciclos, una elongación final de 30 min a 68°C. Para descartar la presencia de contaminaciones, se empleó un control negativo sin ADN.

**Tabla 8.** Primers empleados para la amplificación de ADN de la comunidad de bacterias presentes en la materia fecal de los lechones.

Primer	Sentido	Secuencia
CG-HDA1	Forward	5'-CGC CCG GGG CGC GCCCCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCCTAC GGG AGG CAG T-3'
HDA2	Reverse	5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTGGCA C-3'

Para verificar la amplificación de la fracción 16S del ADN<sub>r</sub> se realizó una electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. El gel fue preparado a una concentración de 2 % en tampón TBE 1X (Tris-Borato-EDTA). En cada pocillo destinado al producto de PCR fueron depositados 3 µl de muestra + 2 µl de buffer de carga con colorante fluorescente GEL RED a una concentración final del 0,01 % (v/v) (Biotium, Freemont, Estados Unidos) y en el pocillo destinado al marcador de peso molecular fueron dispensados 3 µl de solución de marcador de peso molecular comercial 100 pb DNA Ladder (Pb-I Productos Bio-lógicos, Buenos Aires, Argentina) también con 2 µl de buffer de carga. La electroforesis se realizó a 80V durante 40 min empleando TBE 1X como tampón de corrida. Luego de finalizada la electroforesis el gel fue visualizado con luz UV en un transiluminador (Labnet, Woodbridge, Estados Unidos).

### 3.7.8.2.3. Preparación de los geles, electroforesis y tinción

Los productos de PCR fueron separados mediante DGGE utilizando un equipo equipo D-Code Universal Mutation Detection (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos) en geles de 16 cm x 16 cm x 0,1 cm. El gradiente desnaturante empleado en cada gel fue urea-formamida 40% a 60%. Las condiciones de electroforesis utilizadas fueron 60° C, 130 volt y un tiempo de duración de 4 horas (Simpson *et al.*, 2000). Se sembraron en cada pocillo 10 µl de muestra con 10 µl de buffer de carga (2x). Una mezcla de productos de PCR de las cepas bacterianas *E. coli* Nissle, *L. reuteri* DSPV002C y *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* fue utilizada como marcador para normalizar los geles.

Finalizada la electroforesis, los geles fueron teñidos con SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) al 1% v/v durante 15 min y se observaron en un transiluminador de luz azul Safe Imager Blue-Light (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos). Los geles se fotografiaron con una cámara digital (Olympus SZ-11).

### 3.7.8.2.4. Análisis de geles

Posteriormente la imagen de cada uno de los geles se analizó utilizando el programa BioNumerics versión 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Las fotos de los geles sirvieron para la construcción de dendrogramas basados en el método del grupo de pares no

ponderado con el promedio aritmético (UPGMA). Con el objetivo de caracterizar el ecosistema microbiano presente en la materia fecal de los cerdos, se calcularon los índices de diversidad de Shannon, el índice de homogeneidad de Pielou y el índice de riqueza de Margalef.

#### **3.6.8.2.5. Secuenciación**

De cada gel de poliacrilamida se cortaron bandas y fueron colocadas en 50 µL de agua bidestilada estéril durante 48 h a 4 °C para permitir la difusión del ADN. Posteriormente la porción de gel que contenía la banda fue descartada y el ADN disuelto fue reamplificado con los primers HDA-1 y HDA-2 en las mismas condiciones que en la sección 3.7.15.2. La reacción de PCR de cada banda se verificó a través de una electroforesis en gel de agarosa al 2% (v/v) para corroborar la correcta amplificación del ADN. Los productos de PCR amplificados, se purificaron con el kit PURO ADN-Clean Up (PB-L Productos Bio-Lógicos, Bs As, Argentina). Finalmente, los productos de PCR purificados de cada banda, se enviaron a la empresa MACROGEN (Seul, Corea del Sur) para su secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias de 16S ADNr que se encuentran en el GenBank mediante el software BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) del NCBI para identificar los diversos géneros microbianos presentes en las muestras de la materia fecal.

### **3.6.9. Hemograma y bioquímica sanguínea**

#### **3.6.9.1. Eritrograma y leucograma**

Se realizó hemograma completo de los lechones para evaluar los parámetros sanguíneos en los grupos. Semanalmente se obtuvieron muestras de sangre (5 ml) para el estudio de hemograma completo (eritrograma y leucograma) de los animales a partir del día del destete (0 d) y a los 7, 14, 21, 28, 35 y 42 d. La sangre se obtuvo con agujas hipodérmicas 40x8 a partir de vena cava de 4 lechones de GP y 4 lechones de GC seleccionados al azar. Inmediatamente de obtenidas las muestras, se les incorporó ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante (GT – Lab, Rosario, Argentina) y se mantuvieron refrigeradas hasta su procesamiento dentro de las 6 h de extraídas.

Las muestras fueron analizadas en un contador hematológico automatizado Mindray con software para muestras porcinas (Mindray BC-3000Plus, Nanshan, China). Se evaluó recuento de glóbulos rojos (GR) (Cel/µL), recuento de glóbulos blancos (GB) (Cel/µL), recuento de polimorfonucleares (PMN) (cel/µL), recuento de mononucleares (MN) (Cel/µL), hematocrito (%), hemoglobina (g/dL), volumen corpuscular medio (VCM) (fL), hemoglobina corpuscular media (HCM) (pg) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) (g/dL). Una parte de la sangre fue utilizada para obtener la fórmula leucocitaria relativa (FLR)



mediante la realización de un frotis teñido con Giemsa y posterior observación en microscopio para el recuento diferencial. La FLR y el recuento de GB se utilizaron para obtener la fórmula leucocitaria absoluta (FLA) de las diferentes líneas celulares. Además, se realizó el análisis de las células mononucleares en conjunto (monocitos + linfocitos) y de polimorfonucleares (neutrófilos + eosinófilos + basófilos). La determinación de neutrófilos y linfocitos, permitió obtener el índice de neutrófilos/linfocitos (N/L).

### **3.6.9.2. Perfil de bioquímica sanguínea.**

La sangre se obtuvo por punción de vena cava con agujas hipodérmicas 40x8. Inmediatamente de obtenidas las muestras, se las dividió en 2 tubos, con y sin anticoagulante. Las muestras con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante (GT – Lab), se mantuvieron refrigeradas hasta su procesamiento dentro de las 6 h de extraídas. Las muestras sin EDTA, se dejaron a temperatura ambiente para la formación del coágulo. En el laboratorio, las muestras fueron centrifugadas a 3500 *g* x 15 minutos para separar el coágulo del suero (muestra sin EDTA) y el plasma de las células (muestras con EDTA). El suero y el plasma fueron congelados a -20 °C hasta su procesamiento. Las determinaciones realizadas fueron: calcio, mediante el método colorimétrico con Arsenazo III (Calcio Plus, GT Laboratorio S.R.L., Santa Fe Argentina); fósforo inorgánico, con método directo U.V. (Fósforo Inorgánico UV, GT Laboratorio S.R.L., Santa Fe Argentina); fosfatasa alcalina, mediante método cinético a 405 nm según DGKC/SSCC (Fosfatasa alcalina Liquid Plus, GT Laboratorio S.R.L., Santa Fe Argentina); triglicéridos, con método GPO/PAP (Trigliceridos Liquid Plus, GT Laboratorio S.R.L., Santa Fe Argentina) y colesterol con el método CHOD/PAP (Colesterol Liquid Plus, GT Laboratorio S.R.L., Santa Fe Argentina).

### **3.6.10. Parámetros de crecimiento y medidas corporales.**

Se registraron parámetros de crecimiento y medidas corporales el día 0 y semanalmente hasta el día 42 del ensayo. Se registró el peso corporal (PC) (kg) de cada animal, altura a la cruz (AC) (cm), perímetro torácico (PT) (cm), largo total (LT) (cm), ancho de caderas (ACd) (cm) y ancho de hombros (AH) (cm).

### **3.6.11. Consumo de alimento, eficiencia de conversión y ganancia de peso.**

Se registró semanalmente el consumo de alimento por jaula (2 animales) expresado en kg y se calculó la eficiencia de conversión alimenticia por jaula, expresado en unidad de peso de

animal producido por cantidad de alimento consumido. Además, se obtuvo la ganancia de peso semanal (GPS) por jaula, a través de la diferencia entre los pesos semanales.

### **3.6.12. Score fecal y estado de salud.**

Con el fin de evaluar la frecuencia e intensidad de la diarrea, la consistencia fecal (CF) se registró diariamente. Para la caracterización de las heces se utilizó una escala que consideraba: heces formadas aquellas de textura firme, con forma original y de apariencia opaca (score 1); heces pastosas, de textura más suelta, no mantienen su forma original, se aplastan y de apariencia brillante (score 2); heces cremosas, de textura suelta, como papilla, no conservan su forma, con un mayor contenido de agua (score 3) y heces acuosas, no tiene forma, totalmente suelta de muy poco contenido sólido y apariencia líquida (score 4). El score fecal 4, fue considerado como diarrea. (Estanguet et al., 2016).

### **3.6.13. Confirmación de aislamientos de *L. reuteri* DSPV002C mediante electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE).**

Para comprobar si *L. reuteri* DSPV002C wildtype, *L. reuteri* resistente a rifampicina, y *L. reuteri* recuperada de macrocápsulas G:A7,5% presentaban diferencias de los aislamientos de *L. reuteri* resistentes a rifampicina de los d 7, 14, 21, 28, 35 y 42 del ensayo in vivo, se utilizó electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE, del inglés "Pulsed-field gel electrophoresis"). Esta técnica molecular permite diferenciar cepas de la misma especie, por medio de la digestión y separación de moléculas de ADN total con tamaños desde 20 kpb hasta 10 Mpb. Como control de la técnica y como patrón molecular para realizar las comparaciones entre las cepas de campo se utilizó una cepa de *Salmonella braenderup* H9812.

#### **3.6.13.1 Preparación del ADN genómico**

Se realizó un cultivo overnight de cada aislamiento obtenido en diferentes momentos del ensayo. Seguidamente fueron repicados a caldo MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y fueron incubados a 37 °C durante 18 h en aerobiosis. Luego de la incubación, fueron centrifugados durante 5 min a 13.000 g. El sobrenadante fue descartado y el sedimento resuspendido en 1,8 ml de NaCl 0,85 % (Biopack, Buenos Aires, Argentina). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm, ajustando la concentración de las suspensiones celulares a DO 2,0±0,2. Un volumen de 150 µl de las suspensiones celulares ajustadas fue transferido a microtubos de 1,5 ml. Luego, 150 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 2% (Pulsed Field Certified Agarose, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos) fueron adicionados a los 150 µl de la suspensión celular. Inmediatamente, la mezcla fue dispensada en moldes desechables conformando bloques de agarosa (plugs). Se prepararon dos plugs por muestra,

y se dejaron solidificar en la heladera (4 °C) durante 5 min. Posteriormente los plugs fueron transferidos con espátula a tubos falcon con tampón NET con lisozima (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos) e incubados en baño termostático a 37 °C durante 24 h. Cada plug de agarosa se transfirió a un tubo falcon con tampón de lisis Tris 50 mM, ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 50 mM pH 8 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos), lauril sarcosina sódica 1 % (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos) y proteinasa K 0,5 mg/ml (Promega, Madison, USA) y se incubó a 37 °C durante 24 h. Luego, los tubos fueron retirados del baño termostático y el tampón de lisis descartado. Para los lavados, se añadió 10 ml de tampón Tris-EDTA (TE) estéril (Tris 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8.0), dejándose en baño termostático a 55 °C durante 40 min y repitiéndose el lavado 4 veces (Doulgeraki *et al.*, 2010). Finalmente, los plugs de agarosa se trasladaron a microtubos con 2 ml de tampón TE 1X estéril, y se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización posterior.

Para la preparación de los plugs de *Salmonella braenderup* H9812 se utilizó el protocolo descrito en la Red PulseNet (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>). Colonias aisladas fueron crecidas en agar tripticasa de soya durante 24 horas, se preparó una suspensión de las células en buffer (EDTA 100 mM, Tris 100 mM, pH 8.0), La DO se midió a 600 nm, ajustando la concentración de las suspensiones celulares a DO 2,0±0,2. Posteriormente, 150 µl de esta suspensión bacteriana fueron mezclados con 150 µl de agarosa agarosa de bajo punto de fusión 1% y se agregaron 10 µl de proteinasa k (20mg/ml). Luego, doscientos microlitros de la mezcla fueron distribuidos con una pipeta en moldes desechables (Bio-Rad laboratorios). La lisis celular *in situ* fue realizada colocando los bloques de agarosa solidificados en tubos que contenían 5 ml de buffer de lisis (Tris50 mM :EDTA 50 mM, pH 8, Sarcosyl 1%) y 25 µl de proteinasa k (20 mg/ml) e incubados en un baño de agua a 54 °C por 2 h. Seguidamente los bloques fueron lavados para eliminar los restos celulares, dos veces con agua esteril ultrapura a 50 °C y ocho veces con TE (Tris10 mM-EDTA 1mM, pH 8) a 50 °C, durante 15 minutos en baño de agua. Finalmente, los plugs de agarosa se trasladaron a microtubos con 2 ml de tampón TE 1X estéril, y se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización posterior.

### **3.6.13.2. Digestión del ADN genómico**

Para la digestión enzimática del ADN, se realizó una dilución del tampón 10X con agua ultrapura y la enzima de restricción *Sma*I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos). Cada plug de agarosa fue digerido con 40 unidades de enzima durante un tiempo de incubación de 5 h a 25 °C (Langa *et al.*, 2013).

La digestión de los plugs de *Salmonella braenderup* H9812 se realizó utilizando una dilución del tampón 10X con agua ultrapura y la enzima de restricción XBAI (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, Estados Unidos. Cada plug de agarosa fue digerido con 40 unidades de enzima durante un tiempo de incubación de 2 h a 37 °C.

### **3.6.13.3. Electroforesis en campos pulsados**

Los fragmentos de ADN digeridos dentro del plug de agarosa fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa para PFGE al 1% en tampón TBE 0,5X. Una vez solidificado el gel, se incorporó medio plug de agarosa en un pocillo y se adicionó una capa de agarosa al 1% como sellador. La electroforesis se llevó a cabo en un equipo para electroforesis en campo pulsado CHEF-DR III (Bio-Rad®) con buffer TBE 0,5X. Las condiciones electroforéticas fueron 6 V/cm (cambio de orientación inicial 1 s, cambio de orientación final 10 s) durante 20 h a 14 °C (Langa *et al.*, 2013). Después de la electroforesis, los geles fueron teñidos 30 min en bromuro de etidio (10 mg/ml). La imagen fue capturada con un sistema de fotodocumentación.

### **3.6.13.4. Análisis de los patrones de PFGE**

Los perfiles electroforéticos obtenidos mediante PFGE se analizaron con el software PyElph 1.4 para obtener el dendrograma. El método de alineación utilizado fue el ligamiento promedio no ponderado (UPGMA), basado en un coeficiente de similitud “Dice” y una tolerancia en la posición de bandas de 1%. El dendrograma fue analizado de acuerdo al criterio de tipificación de cepas bacterianas (Tenover *et al.*, 1995), para determinar si existían diferencias entre las cepas en estudio.

### **3.6.14. Histomorfometría del intestino delgado**

Este estudio se realizó para evaluar el efecto del tratamiento probiótico sobre las vellosidades intestinales y la profundidad de criptas en los lechones del GC y GP.

Trozos de aproximadamente 2 cm de largo fueron abiertos para exponer las vellosidades y fijarlas en formol tamponado al 10%, procesadas siguiendo protocolos histológicos de rutina para efectuar la inclusión en parafina (Woods y Ellis, 1994). Se realizaron cortes de 5 µm de espesor, los que fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina (H-E) (García del Moral, 1993). De cada muestra se realizaron 3 cortes no contiguos. Cada corte fue analizado mediante un microscopio binocular con iluminación LED (Zeiss, modelo Axio Lab A1) y fotografiado (Zeiss, modelo AxioCam ERc 5s). A partir de las fotografías fue realizado un análisis de imágenes y la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas fueron medidas solo cuando la vellosidad estuvo bien orientada y se podía apreciar su respectiva

cripta. De cada corte se midieron las 10 vellosidades más largas desde la punta hasta la apertura de la cripta; y sus respectivas criptas, desde su apertura hasta su base. Dichas mediciones se realizaron con el programa Zen 2.6 (Blue Edition, ZEISS Microscopy).

### **3.6.15. Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados mediante el programa INFOSTAT versión 2011 (InfoStat Group, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Los resultados del análisis microbiológico fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA para medidas repetidas y ANOVA de una vía. Con el fin de establecer diferencias dentro de un mismo grupo a lo largo del ensayo se utilizó el tiempo como factor aplicando ANOVA de una vía.

Los índices de diversidad de Shannon, homogeneidad de Pielou y el índice de riqueza de Margalef fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de medidas repetidas. Para las comparaciones entre grupos en un momento específico del ensayo se utilizó ANOVA de una vía. Para establecer diferencias dentro de un mismo grupo a lo largo del ensayo se utilizó el tiempo como factor aplicando ANOVA de una vía con test de Duncan.

Los datos hematológicos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de medidas repetidas. Para las comparaciones entre grupos en un momento específico del ensayo se utilizó ANOVA de una vía. Con el fin de establecer diferencias dentro de un mismo grupo a lo largo del ensayo se utilizó el tiempo como factor aplicando ANOVA de una vía con test de Duncan.

Las variables de bioquímica sanguínea fueron analizadas mediante ANOVA de medidas repetidas. Para las comparaciones entre grupos en un momento específico del ensayo se utilizó ANOVA de una vía. Con el fin de establecer diferencias dentro de un mismo grupo a lo largo del ensayo se utilizó el tiempo como factor aplicando ANOVA de una vía con test de Duncan.

Los parámetros de crecimiento, medidas corporales, consumo de alimento, eficiencia de conversión y ganancia de peso, fueron analizados mediante análisis ANOVA medidas repetidas. El score fecal se analizó mediante un ANOVA de medidas repetidas con variable de respuesta binaria y función de enlace logística.

Los datos de histomorfometría fueron evaluados mediante prueba t de Student.

El nivel de significación estadístico fijado para todos los análisis fue de  $p < 0.05$ .

## 4. Resultados

## **4.1. Producción de macrocápsulas probióticas**

### **4.1.1. Evaluación de las características físicas de los materiales de pared individuales**

Las soluciones A1, G1 y Ga1 presentaron consistencia líquida en  $t=0$  (tabla 9). Los componentes de las soluciones 1% p/v no se separaron en fases en  $t=0$  y las tres presentaron adherencia al soporte. A  $t= 4h$ , las tres soluciones mantuvieron una consistencia líquida, los componentes no se separaron de fases y mantuvieron la adherencia al soporte. Los resultados obtenidos para la A5, G5 y Ga5 fueron similares a los obtenidos en las soluciones de 1% p/v, con consistencia líquida, sin separación de fases y con adherencia al soporte en  $t=0$  y  $t= 4h$ .

Las soluciones A10, A15 y A20 tuvieron una consistencia semisólida y sin separación de fases en ambos tiempos de evaluación ( $t=0$  y  $t= 4h$ ). Se observó adherencia al soporte en  $t=0$  y  $t= 4h$  para A10. Para las concentraciones de A15 y A20, no hubo adherencia en  $t=0$  y  $t= 4h$  (tabla 9).

La goma arábica en las soluciones Ga10, Ga15 y Ga20 presentó una consistencia líquida en  $t=0$ . En  $t=4h$ , las soluciones Ga15 y Ga20, fueron sólidas, mientras que la solución Ga10 presentó consistencia semilíquida. En  $t=0$ , ninguna de las tres soluciones (Ga10, Ga15 y Ga20) de goma arábica se separó en fases y las tres se adhirieron al soporte. En  $t=4h$ , no hubo separación de fases en ninguna de las 3 soluciones. En ese mismo tiempo, la solución Ga10 presentó adherencia al soporte, mientras que las soluciones Ga15 y Ga20 no se adhirieron al soporte.

Las soluciones G10, G15 y G20 presentaron consistencia semisólida en ambos tiempos de evaluación ( $t=0$  y  $t=4h$ ). No hubo separación de fases en ninguna de las tres soluciones y presentaron adherencia al soporte en  $t=0$  y  $t=4h$  (tabla 9).

Para la conformación de las macrocápsulas, las características físicas más adecuadas de los materiales son, por un lado, que no se presente separación de fases entre los componentes, sino que formen una matriz homogénea. En segundo lugar, que no se presente adherencia al soporte, para una fácil manipulación al retirar las matrices de los moldes. En tercer lugar, que sean semilíquidas, semisólidas o sólidas para posibilitar la formación de las macrocápsulas. Todos los materiales de pared evaluados, presentaron las características adecuadas en concentraciones superiores al 5% p/v. Por estos resultados se continuaron los estudios sobre las características físicas de las soluciones con los mismos materiales de pared pero combinados entre ellos en diferentes proporciones y con concentraciones finales iguales o superiores al 5% p/v.

**Tabla 9.** Características físicas de los materiales individuales en diferentes concentraciones para la conformación de la matriz de macrocápsulas.

Materiales de pared	Consistencia								Separación de fases				Adhesión al soporte			
	t=0				t= 4h				t=0		t= 4h		t=0		t= 4h	
	Líquida	Semilíquida	Semisólida	Sólida	Líquida	Semilíquida	Semisólida	Sólida	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
A1	X				X				X		X		X		X	
A5	X				X				X		X		X		X	
A10			X				X		X		X		X		X	
A15			X				X		X		X			X		X
A20			X				X		X		X			X		X
Ga1	X				X				X		X		X		X	
Ga5	X				X				X		X		X		X	
Ga10	X					X			X		X		X		X	
Ga15	X						X	X	X		X		X			X
Ga20	X						X	X	X		X		X			X
G1	X				X				X		X		X		X	
G5	X				X				X		X		X		X	
G10			X				X		X		X		X		X	
G15			X				X		X		X		X		X	
G20			X				X		X		X		X		X	

Tiempo 0 (t=0) y tiempo 4 horas (t= 4h). Si: presenta adherencia al soporte o separación de fases, según corresponda. No: no presenta adherencia al soporte o separación de fases, según corresponda.

#### 4.1.2. Evaluación de los materiales de pared combinados

Las mezclas de gelatina y goma arábica G:Ga5, G:Ga10 y G:Ga15 presentaron una consistencia líquida en t=0. En cambio, G:Ga20 presentó consistencia semilíquida en el mismo tiempo de evaluación. En t=4h la consistencia de G:Ga20 fue sólida y semisólida para las demás concentraciones. Se observó separación de fases de los materiales en las cuatro soluciones que contenían gelatina y goma arábica y ninguna presentó adherencia al soporte en t=0 ni en t=4h (Tabla 10).



Las mezclas de gelatina y almidón G:A10, G:A15 y G:A20 presentaron una consistencia semilíquida en  $t=0$ , mientras que G:A5 fue líquida en el mismo tiempo de evaluación. A  $t=4h$ , la consistencia fue semilíquida para G:A5, semisólida para G:A10 y G:A15 y sólida para G:A20. Para la mezcla de gelatina y almidón, no hubo separación de fases en G:A5, G:A10, G:A15 y G:A20 en  $t=0$  y  $t=4h$ . A su vez, ninguna de estas cuatro mezclas presentó adherencia al soporte (Tabla 10).

La combinación de almidón y goma arábiga presentó una consistencia líquida en A:Ga5, A:Ga10, A:Ga15 y A:Ga20 en  $t=0$ . En  $t=4h$  la clasificación continuó líquida para A:Ga5 y fue semilíquida para las demás concentraciones. Todas las concentraciones de las mezclas de almidón y goma arábiga tuvieron separación en fases y no presentaron adherencia al soporte en  $t=0$  y  $t=4h$  (tabla 10).

Para las mezclas de los tres materiales, gelatina, almidón y goma arábiga en proporciones iguales, la consistencia en  $t=0$  fue líquida para G:A:Ga10 y G:A:Ga15 y semilíquida para G:A:Ga20. Las tres concentraciones presentaron separación en fases en  $t=0$  y en  $t=4h$ . No hubo adherencia al soporte en las tres concentraciones en ninguno de los dos tiempos de evaluación (tabla 10).

**Tabla 10.** Características físicas de las soluciones de los materiales combinados en diferentes concentraciones para la conformación de la matriz de macrocápsulas probióticas.

Materiales de pared	Consistencia								Separación de fases				Adhesión al soporte			
	t=0				t= 4h				t=0		t= 4h		t=0		t= 4h	
	Líquida	Semilíquida	Semisólida	Sólida	Líquida	Semilíquida	Semisólida	Sólida	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
5 % p/v concentración final																
G:Ga5	X					X		X		X			X		X	
G:A5	X				X				X		X		X		X	
A:Ga5	X			X				X		X			X		X	
10% p/v concentración final																
G:Ga10		X				X		X		X			X		X	
G:A10		X				X			X		X		X		X	
A:Ga10	X				X			X			X		X		X	
G:A:Ga10	X						X	X		X		X			X	
15% p/v concentración final																
G:Ga15		X				X		X		X			X		X	
G:A15		X				X			X		X		X		X	
A:Ga15	X				X			X		X			X		X	
G:A:Ga15	X						X	X		X		X			X	
20% p/v concentración final																
G:Ga20		X					X	X		X			X		X	
G:A20		X					X		X		X		X		X	
A:Ga20	X				X			X		X			X		X	
G:A:Ga20		X					X	X		X		X			X	
Metodología utilizada por Fakhouri <i>et al.</i> (2015)																
G:A9		X				X			X		X		X		X	
G:A7,5		X				X			X		X		X		X	
G:A6	X				X				X		X		X		X	

Tiempo 0 (t=0) y tiempo 4 horas (t= 4h). Si: presenta adherencia al soporte o separación de fases, según corresponda. No: no presenta adherencia al soporte o separación de fases, según corresponda.

Las mezclas obtenidas según Fakhouri *et al.* (2015), G:A9 y G:A7,5 presentaron una consistencia semilíquida en t=0, mientras que G:A6 fue líquida. A t=4h), las mezclas G:A9 y G:A7,5 fueron semisólidas y G:A6 fue semilíquida (tabla 11). Ninguna de las tres combinaciones presentaron

separación de fases en  $t=0$  y tampoco tuvieron adhesión al soporte. En  $t=4h$  no hubo separación en fases ni adherencia al soporte. Las mezclas G:A9 y G:A7,5 presentaron un comportamiento similar en las tres variables evaluadas.

Las mezclas que incluían goma arábiga en su composición, presentaron separación en fases luego de 4h evitando la formación de una matriz homogénea. Por este motivo, se decidió descartar a la misma como material para la encapsulación. Las mezclas de G:A no se separaron en fases y no presentaron adherencia al soporte en ninguna de las concentraciones preparadas.

Teniendo en cuenta estos resultados, y en base a las características que buscamos en los materiales, se decidió seguir evaluando a la gelatina y el almidón para la conformación de las macrocápsulas. Se seleccionaron las matrices G:A6, G:A7,5 y G:A20, incluyendo de esta manera una mezcla semilíquida, una semi-sólida y una sólida, las cuáles no presentaban adherencia al soporte ni separación de fases, para evaluar su comportamiento en diferentes métodos de secado.

#### **4.1.3. Evaluación de diferentes métodos de secado de las matrices**

El tiempo de secado de las matrices en temperatura ambiente fue de 72 h. Las matrices presentaron adherencia al soporte y se observó separación de fases de los materiales, presentaron encogimiento de la matriz y no hubo cambio de color (tabla 11). La adherencia al soporte provocaba el rompimiento de las matrices al intentar sacarlas del mismo.

El tiempo de secado en estufa fue de 23-24 h. Las matrices secadas en estas condiciones presentaron adhesión al soporte, separación de fases, encogimiento y cambio de color. Luego del tiempo de secado, las matrices se encontraban dentro de los soportes resquebrajadas y la adhesión dificultaba la extracción de los mismos.

El secado por liofilización fue de 36 h totales (incluido el tiempo de congelación). Las matrices G:A6 y G:A7,5 no presentaron adherencia al soporte, no tuvieron encogimiento ni cambio de color y tampoco presentaron separación de fases. Si bien luego del proceso de secado mantenían su integridad, al sacarlas del soporte se resquebrajaban fácilmente. La matriz G:A20 tampoco presentó encogimiento ni cambio de color, no presentó adherencia al soporte y no tuvo separación de fases. Al sacarla del soporte, no se resquebrajaba (tabla 12).

El método de secado más eficiente en pérdida de agua fue el secado mediante liofilización. La matriz G:A20 tuvo una mayor pérdida de peso en el secado por liofilización que en el secado por

estufa y temperatura ambiente (Tabla 12). Para la matriz G:A7,5 la pérdida de peso también fue mayor en el liofilizado, seguido por el secado en estufa y temperatura ambiente. Finalmente, la matriz G:A6 presentó resultados similares a las otras matrices (tabla 12)

**Tabla 11.** Evaluación de las características físicas de mezclas de gelatina y almidón secadas con diferentes métodos para la conformación de la matriz de macrocápsulas probióticas.

Matrices	Cambio de estructura		Cambio de color		Separación de fases		Adherencia soporte	
	Con encogimiento	Sin encogimiento	Con cambio de color	Sin cambio de color	Si	No	Si	No
<b>Secado en ambiente</b>								
G:A20	X			X	X		X	
G:A7,5	X			X	X		X	
G:A6	X			X	X		X	
<b>Secado en estufa</b>								
G:A20	X		X		X		X	
G:A7,5	X		X		X		X	
G:A6	X		X		X		X	
<b>Secado por liofilización</b>								
G:A20		X		X		X		X
G:A7,5		X		X		X		X
G:A6		X		X		X		X

Matrices: 10% p/v gelatina y 10% p/v de almidón (G:A20); 5% p/v gelatina y 2,5% p/v almidón (G:A7,5) y 4% p/v almidón y 2% p/v gelatina (G:A6). Si: presenta adherencia al soporte o separación de fases, según corresponda. No: no presenta adherencia al soporte o separación de fases, según corresponda.

**Tabla 12.** Porcentaje de pérdida de agua (%m/m) durante el secado de matrices de gelatina y almidón.

Matriz	Método de secado	Tiempo de secado	% m/m
G:A20	Temperatura ambiente	72 h	74,95
G:A7,5			85,68
G:A6			88,84
G:A20	Estufa	23-24 h	78,56
G:A7,5			90,77
G:A6			92,33
G:A20	Liofilización	36 h	82,03
G:A7,5			91,07
G:A6			92,20

Matrices: 10% p/v gelatina y 10% p/v de almidón (G:A20); 5% p/v gelatina y 2,5% p/v almidón (G:A7,5) y 4% p/v almidón y 2% p/v gelatina (G:A6).

Todas las matrices evaluadas presentaron características adecuadas cuando las mismas fueron secadas mediante liofilización. Para continuar con los estudios de entrapamiento de las bacterias, se utilizaron las matrices G:A7,5 y G:A20.

## 4.2. Entrampamiento de *L. reuteri* DSPV002C

### 4.2.1. Evaluación de diferentes métodos de secado de *L. reuteri* DSPV002C en diferentes matrices

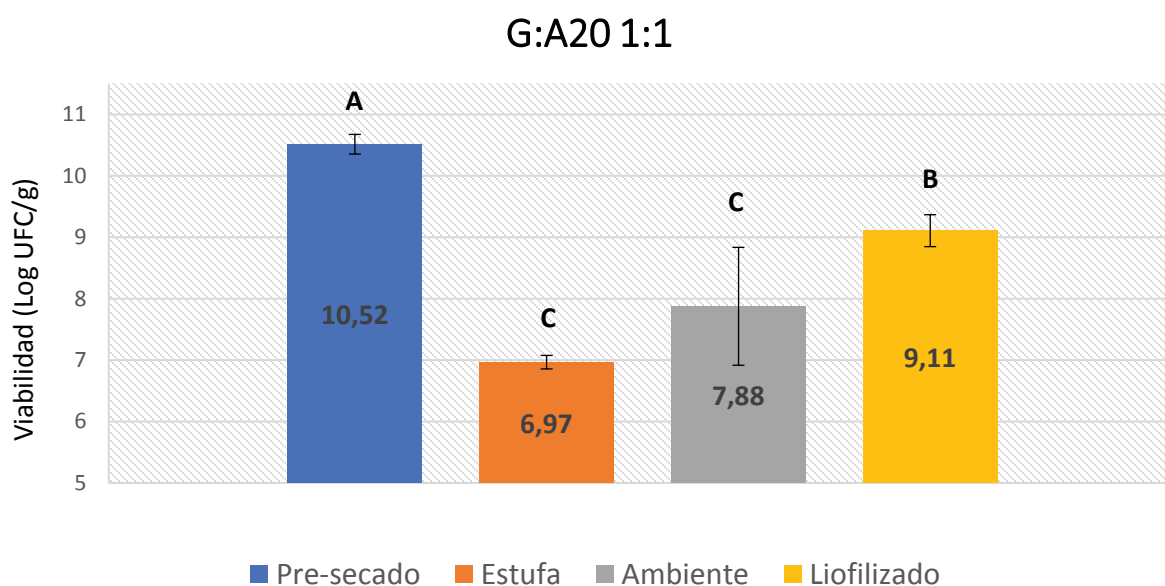
No se encontraron diferencias en la viabilidad bacteriana entre las matrices G:A7,5 1:1 y G:A20 1:1 previo al secado ( $P=0,170$ ). La mezcla del inóculo con la matriz G:A20 1:1 presentó una viabilidad pre-secado de  $10,52 \pm 0,16$  Log (UFC/g). Luego del proceso de secado, se observó disminución de la viabilidad en las tres condiciones de secado ( $P < 0,001$ ). Las mezclas secadas en estufa y ambiente fueron las de mayor pérdida de viabilidad, con  $6,97 \pm 0,11$  Log (UFC/g) y  $7,88 \pm 0,96$  Log (UFC/g) respectivamente. El secado mediante liofilización, con  $9,11 \pm 0,26$  Log (UFC/g), fue el de menor pérdida de viabilidad en comparación al pre-secado (Figura 6).

La mezcla G:A7,5 1:1 tuvo una viabilidad pre-secado de  $10,78 \pm 0,17$  Log (UFC/g). La viabilidad disminuyó en las 3 condiciones de secado ( $P > 0,001$ ). La liofilización con  $9,23 \pm 0,24$  Log (UFC/g) fue el método que menor pérdida de viabilidad presentó, disminuyendo en  $1,55$  Log ( $P=0,036$ ).

El secado a temperatura ambiente mantuvo una viabilidad de  $8,10 \pm 0,8$  Log UFC/g, presentando una pérdida de 2,68 Log (UFC/g) y el secado en estufa, con una viabilidad de  $7,86 \pm 0,18$  Log (UFC/g), perdió 2,92 Log (UFC/g), ambas pérdidas mayores que en liofilización (Figura 7).

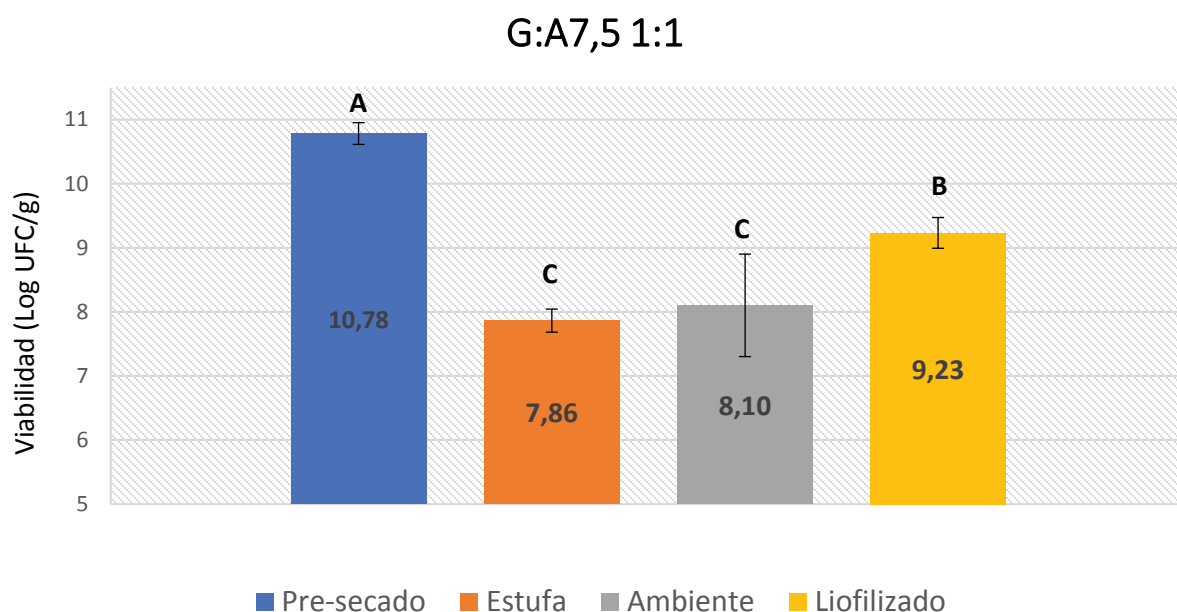
Tanto en G:A20 1:1 como G:A7,5 1:1, la menor pérdida de viabilidad se observó en el secado mediante liofilización. (Figuras 6 y 7).

**Figura 6.** Viabilidad de inóculo probiótico en la matriz G:A20 antes y después de diferentes condiciones de secado.



G:A20 1:1: Matrices de Gelatina 10% p/v + Almidón 10% p/v, proporción 1:1 inóculo:matriz. Pre-secado: G:A20 1:1 húmedas; Estufa: G:A20 1:1 secadas a  $37 \pm 2$  °C durante 24h; Ambiente: G:A20 1:1 secadas a  $25 \pm 2$  °C durante 72h; Liofilización: G:A20 1:1 secadas durante 36h. Los recuentos se muestran como la media  $\pm$  el desvío estándar. Diferentes letras indican diferencia estadística ( $P < 0,05$ )

**Figura 7.** Viabilidad de inóculo probiótico en la matriz G:A7,5 antes y después de diferentes condiciones de secado.



G:A7,5 1:1: Matrices de gelatina 5% p/v + almidón 2,5% p/v, proporción 1:1 inóculo:matriz. Pre-secado: G:A7,5 1:1 húmedas; Estufa: G:A7,5 1:1 secadas a  $37\pm 2$  °C durante 24h; Ambiente: G:A7,5 1:1 secadas a  $25\pm 2$  °C durante 72h; Liofilización: G:A7,5 1:1 secadas durante 36h. Los recuentos se muestran como la media  $\pm$  el desvío estándar. Diferentes letras indican diferencia estadística ( $P < 0,05$ )

#### 4.2.2. Evaluación de la viabilidad de macrocápsulas liofilizadas con diferentes proporciones del inóculo:matriz y crioprotectores

La viabilidad no estuvo influenciada por las matrices estudiadas: G:A20 y G:A7,5 ( $P=0,142$ ). Con respecto a los medios crioprotectores, la viabilidad luego del proceso de secado, fue mayor al utilizar el PS que utilizando maltodextrina ( $P=0,008$ ).

El peso promedio de las macrocápsulas pre-secado fue de  $0,35\pm 0,05$  g por macrocápsula. Luego del proceso de liofilización, el peso fue de  $0,09\pm 0,01$  g por macrocápsula. Para el inóculo entrampado en G:A20, se encontró una mayor recuperación de bacterias por macrocápsula en G:A20 9:1 ( $P < 0,001$ ) (Figura 8). En las macrocápsulas que incluyeron maltodextrina como CP, los recuentos fueron 2,9 Log UFC/cápsula (UFC/cáp) superiores en las macrocápsulas G:A20M 9:1 ( $10,29\pm 0,02$  Log UFC/cáp) en comparación con las macrocápsulas G:A20M 1:1 ( $7,8\pm 0,54$  Log UFC/cáp). Los recuentos de las macrocápsulas para las demás proporciones se encontraron

entre  $7,93 \pm 0,23$  Log UFC/cáp para la macrocápsula G:A20M 2:1,  $8,11 \pm 0,25$  Log UFC/cáp para la macrocápsula G:A 20M 3:1 y  $8,23 \pm 0,07$  Log UFC/cáp para la macrocápsula G:A20M 5:1 (Figura 8).

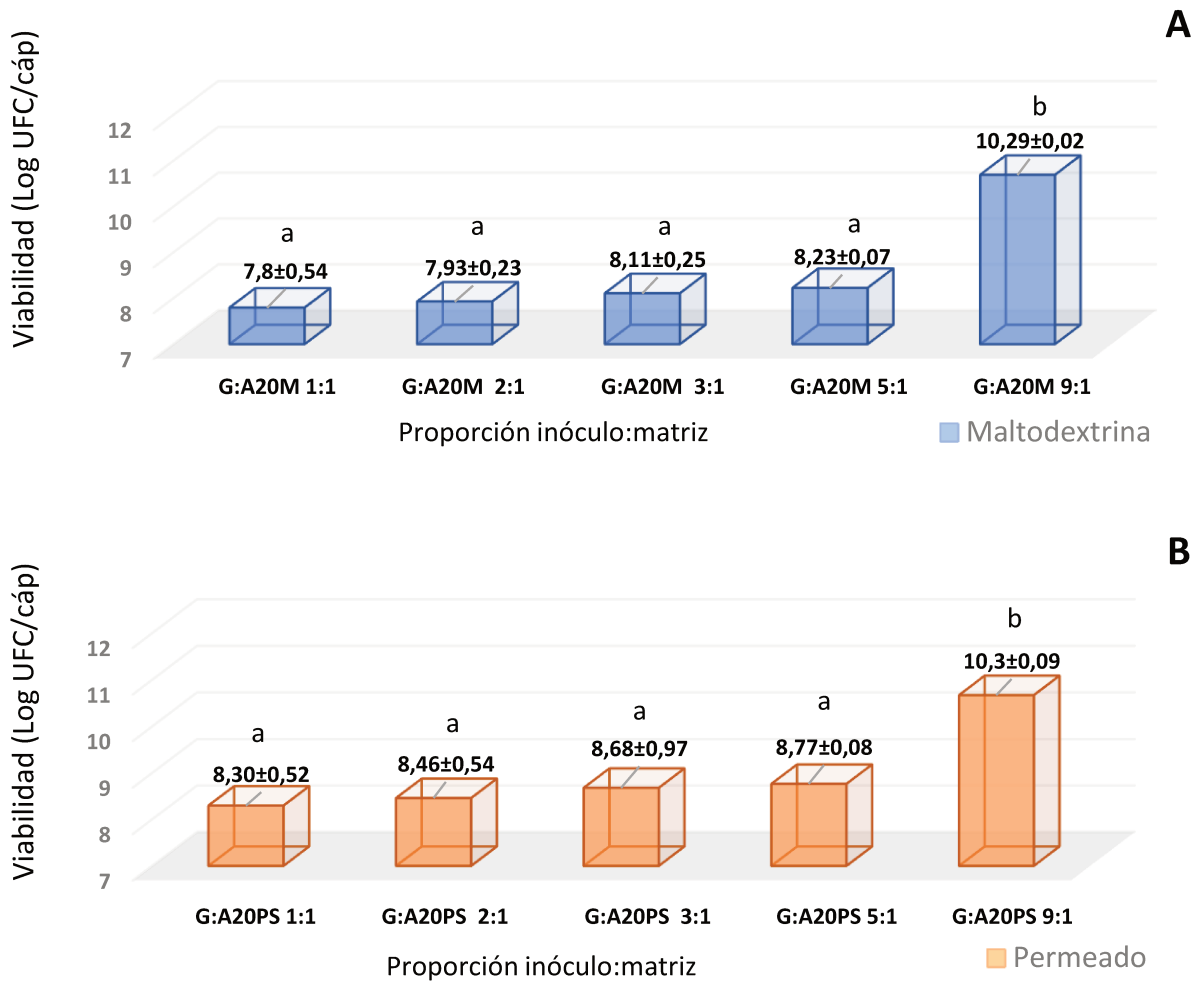
Cuando se incluyó el PS como CP, las macrocápsulas G:A20PS 1:1 tuvieron una concentración de  $8,30 \pm 0,52$  Log UFC/cáp, con un recuento de 2.0 Log UFC/cáp por debajo de la mezcla G:A20PS 9:1 ( $10,29 \pm 0,09$  Log UFC/cáp). Los recuentos en las macrocápsulas de las demás proporciones fueron  $8,46 \pm 0,54$  Log UFC/cáp para G:A20PS 2:1,  $8,68 \pm 0,97$  Log UFC/cáp para G:A20PS 3:1 y  $8,77 \pm 0,08$  Log UFC/cáp para G:A20PS 5:1.

Las macrocápsulas con matriz G:A7,5 mostraron resultados similares a las cápsulas G:A20, con mayor viabilidad post-secado en G:A7,5 9:1 ( $P < 0,001$ ) (Figura 9). Al utilizar el CP maltodextrina, la viabilidad fue  $2,02$  Log UFC/cáp mayor en las macrocápsulas G:A7,5M 9:1 ( $10,29 \pm 0,11$  Log (UFC/cáp)) en comparación con G:A7,5M 1:1 ( $8,27 \pm 0,57$  Log UFC/cáp). Los recuentos de las macrocápsulas para las demás proporciones se encontraron entre  $8,16 \pm 0,32$  Log UFC/cáp para la macrocápsula G:A7,5M 2:1,  $8,64 \pm 0,29$  Log UFC/cáp para la macrocápsula G:A7,5M 3:1 y  $8,87 \pm 0,39$  Log UFC/cáp para la macrocápsula G:A7,5M 5:1.

En las macrocápsulas G:A7,5 con PS como CP, se encontraron diferencias de  $1,82$  Log entre las G:A7,5PS 1:1 ( $8,46 \pm 0,58$  Log (UFC/cáp)) y G:A7,5PS 9:1 ( $10,29 \pm 0,01$  Log (UFC/cáp)). Las macrocápsulas G:A7,5PS 2:1 tuvieron un recuento de  $8,67 \pm 0,56$  Log (UFC/cáp), para G:A7,5PS 3:1 el recuento fue de  $9,01 \pm 0,45$  Log (UFC/cáp) y para G:A7,5PS 5:1 fue de  $9,08 \pm 0,02$  Log (UFC/cáp).

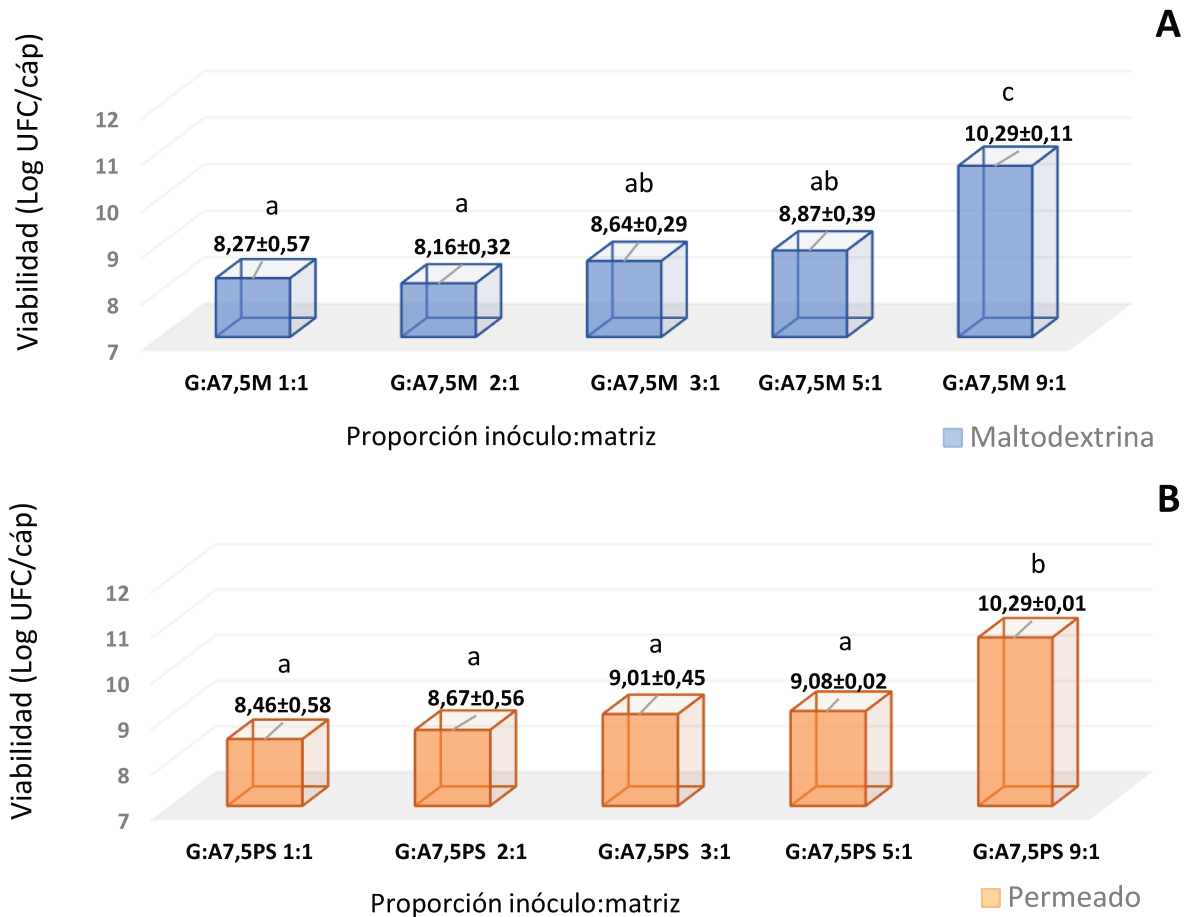


**Figura 8.** Viabilidad de *L. reuteri* DSPV002C en macrocápsulas liofilizadas con diferentes proporciones de inóculo:matriz G:A20.



G:A20: macrocápsulas con 10% p/v gelatina y 10% p/v de almidón con diferentes proporciones de inóculo. 1:1: 1 parte de inóculo y 1 parte de matriz; 2:1: 2 partes de inóculo y 1 parte de matriz; 3:1: 3 partes de inóculo y 1 de matriz; 5:1: 5 parte de inóculo y 1 de matriz; 9:1: 9 partes de matriz y 1 de inóculo. A. Maltodextrina como crioprotector (G:A20M). B. Permeado de suero como crioprotector (G:A20PS). Los recuentos se muestran como la media ± el desvío estándar. Letras distintas significan diferencias dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ).

**Figura 9.** Viabilidad de *L. reuteri* DSPV002C en macrocápsulas liofilizadas con diferentes proporciones de inóculo:matriz G:A7,5.



G:A7,5: macrocápsulas con 5% p/v gelatina y 2,5% p/v de almidón con diferentes proporciones de inóculo. 1:1: 1 parte de inóculo y 1 parte de matriz; 2:1: 2 partes de inóculo y 1 parte de matriz; 3:1: 3 partes de inóculo y 1 de matriz; 5:1: 5 parte de inóculo y 1 de matriz; 9:1: 9 partes de matriz y 1 de inóculo. A. Maltodextrina como crioprotector (G:A7,5M). B. Permeado de suero como crioprotector (G:A7,5PS). Los recuentos se muestran como la media  $\pm$  el desvío estándar. Letras distintas significan diferencias dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ).

En conclusión, las macrocápsulas con mayores recuentos luego del proceso de liofilizado fueron las que tuvieron una proporción 9:1 tanto con la matriz G:A7,5 como G:A20. Con respecto a los crioprotectores, si bien el PS fue mejor que la maltodextrina en la protección del inóculo probiótico en el proceso de liofilizado, no hubo diferencias entre CP cuando se comparó la viabilidad de las mezclas con proporciones inóculo:matriz 9:1. Por lo tanto, para los ensayos siguientes de

viabilidad de *L. reuteri* DSPV002C en el tiempo, se encapsuló el inóculo en macrocápsulas G:A 7,5 9:1 y G:A 20 9:1, tanto con PS (G:A7,5PS 9:1 y G:A20PS 9:1), como con maltodextrina (G:A7,5M 9:1 y G:A20M 9:1).

### **4.3 Determinación de la viabilidad bacteriana dentro de las macrocápsulas a través del tiempo**

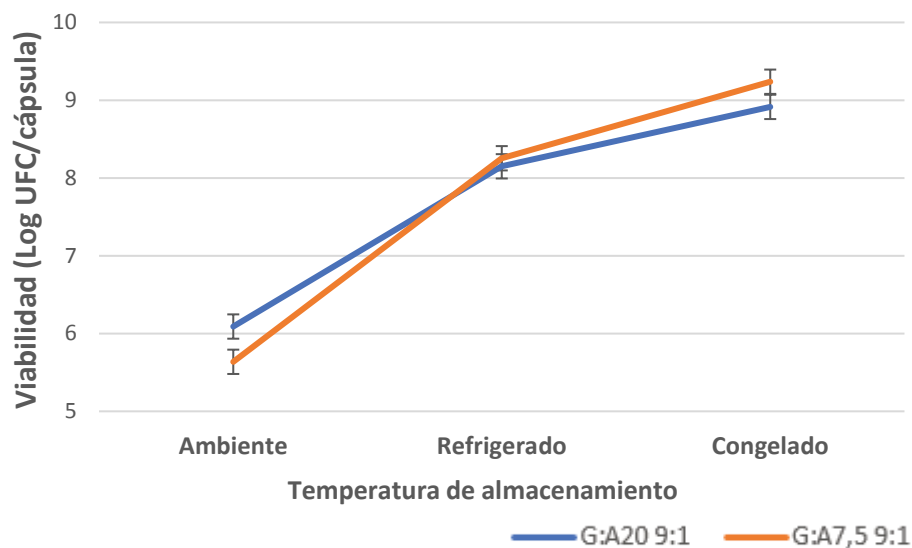
#### **4.3.1. Viabilidad bacteriana dentro de las macrocápsulas a través del tiempo**

Se encontraron diferencias en la viabilidad de las macrocápsulas en los factores: CP, envasado y temperatura de almacenamiento. La utilización de PS como CP, tuvo un efecto positivo sobre la viabilidad de la cepa en comparación a la maltodextrina ( $P < 0,01$ ).

La viabilidad de las macrocápsulas envasadas al vacío fue mejor a lo largo del tiempo en comparación a las macrocápsulas envasadas sin vacío ( $P < 0,01$ ). La temperatura de almacenamiento también influyó sobre la viabilidad, las macrocápsulas mantenidas en congelación fueron las de mayor viabilidad, seguidas por las refrigeradas y las mantenidas a temperatura ambiente ( $P < 0,01$ ).

Además, si bien las macrocápsulas con las matrices G:A20 y G:A7,5 tuvieron un comportamiento similar ( $P = 0,733$ ), la interacción de matriz con la temperatura de almacenamiento mostró diferencias en las interacciones ( $P > 0,001$ ). En esta interacción, las macrocápsulas con matriz G:A20 mantenidas a temperatura ambiente presentaron mayor viabilidad que las macrocápsulas con matriz G:A7,5, en cambio, en refrigeración no hubo diferencias y en congelación, las macrocápsulas con matriz G:A7,5 presentaron mejor viabilidad que las macrocápsulas con matriz G:A20 (Figura 10).

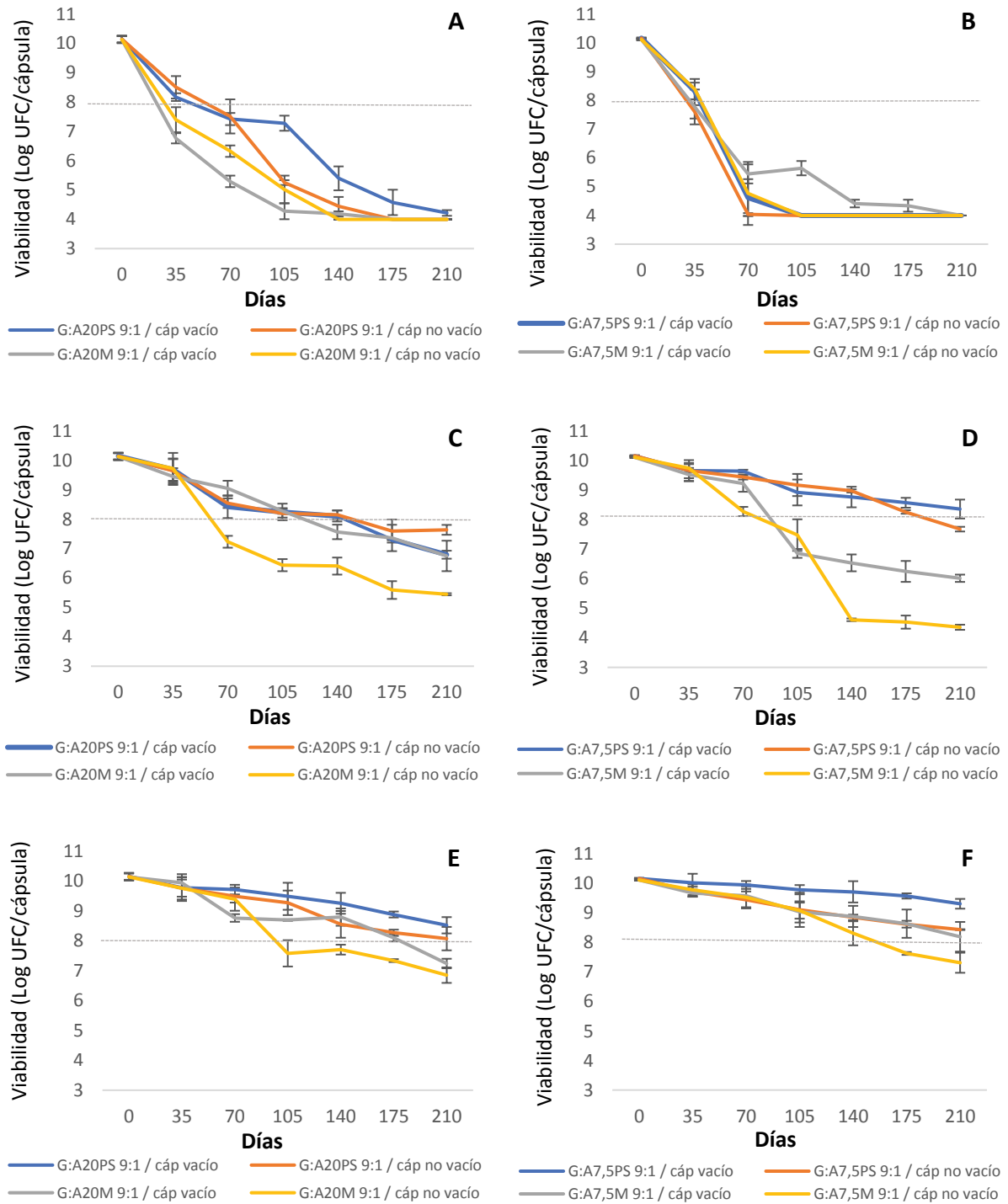
**Figura 10.** Interacción entre el tipo de matriz (G:A7,5 9:1 y G:A20 9:1) y diferentes temperaturas de almacenamiento de macrocápsulas (ambiente, refrigeración y congelación) sobre la viabilidad de *L. reuteri* DSPV002C



G:A20 9:1: macrocápsulas compuestas por: gelatina 10% p/v + almidón 10% p/v. G:A7,5 9:1; macrocápsulas compuestas por gelatina 5% p/v + almidón 2,5% p/v (G:A7,5). Los recuentos se muestran como la media  $\pm$  el error estándar.

A los 35 d de almacenamiento a temperatura ambiente, G:A20PS 9:1 en vacío y G:A20M 9:1 sin vacío mantuvieron la viabilidad por encima de 8 Log UFC/cáp (Figura 11 A). Lo mismo ocurrió con las macrocápsulas G:A7,5PS 9:1 en vacío y G:A7,5M 9:1 sin vacío (Figura 11 B). A los 70 d de almacenamiento, todas las macrocápsulas almacenadas en temperatura ambiente, presentaron una viabilidad igual o inferior a 7,5 Log UFC/cáp. A los 105 d las macrocápsulas G:A20PS 9:1 envasada al vacío presentaron una viabilidad de 7,2 Log UFC/cáp siendo la de mayor viabilidad hasta los 210 d con 4,21 Log UFC/cáp. EL resto de las macrocápsulas presentaron una viabilidad inferior a los 4 Log UFC/cáp a los 210 d (Figura 11 A y B).

**Figura 11.** Viabilidad en el tiempo de *L. reuteri* DSPV002C en macrocápsulas G:A20 9:1 y G:A7,5 9:1 conservadas a temperatura ambiente, en refrigeración y en congelamiento con diferentes crioprotectores y diferentes condiciones de atmósfera.



G:A20: macrocápsula conformada por gelatina 10% + almidón 10% más la adición de maltodextrina (G:A20M) o permeado de suero (G:A20PS) al 10% como crioprotectores, envasadas con vacío (cáp vacío) y sin vacío (cáp no vacío). G:A7,5: macrocápsula conformada por gelatina 5% + almidón 2,5% más la adición de maltodextrina (G:A7,5M) o permeado de suero (G:A7,5PS) al 10% como crioprotectores, envasadas con vacío (cáp vacío) y sin vacío (cáp no vacío). La línea gris punteada marca la DMR. A-B: conservadas a temperatura ambiente. C-D: conservadas en refrigeración. E-F: conservadas en congelación. Los recuentos se muestran como la media  $\pm$  el desvío estándar.

Las macrocápsulas almacenadas en refrigeración presentaron una viabilidad superior a los 8 Log UFC/cáp a los 70 d a excepción de G:A20M 9:1 sin vacío, que presentó 7,23 Log UFC/cáp (Figura 11 C). Hasta los 140 d de almacenamiento, G:A20PS 9:1 en vacío y sin vacío, mantuvieron la viabilidad por encima de los 8 Log UFC/cáp. Lo mismo ocurrió con G:A7,5PS 9:1 con y sin vacío hasta los 175 d (Figura 11 D). Finalmente G:A7,5PS 9:1 con vacío mantuvo la viabilidad por encima de los 8 Log hasta los 210 d, siendo la de mayor viabilidad en almacenamiento en refrigeración.

Todas las macrocápsulas almacenadas en congelación mantuvieron una viabilidad por encima de los 9,3 Log UFC/cáp hasta los 70 d (Figura 11 E y F). Las macrocápsulas G:A7,5PS 9:1 con vacío, fueron las de mayor viabilidad hasta los 210 d, con 9,3 Log UFC/cáp. Las macrocápsulas G:A20PS 9:1 con y sin vacío mantuvieron una viabilidad por encima de los 8 Log UFC/cáp hasta los 210 d. Lo mismo ocurrió con G:A7,5PS 9:1 sin vacío y con G:A7,5M con vacío. El resto de las macrocápsulas presentaron una viabilidad entre 6,84 y 7,31 Log UFC/cáp a los 210 d.

De todas las condiciones de almacenamiento, las macrocápsulas mantenidas en congelación, con PS como CP y envasadas al vacío fueron las que mostraron mejor viabilidad hasta los 210 d de almacenamiento. Si bien, no hubo diferencias entre las matrices evaluadas, la interacción temperatura de almacenamiento\*matriz, mostró que a temperatura de congelación, las macrocápsulas con G:A7,5 mantuvieron mejor la viabilidad. Por lo tanto, las macrocápsulas G:A7,5PS 9:1 fueron las seleccionadas para continuar los estudios.

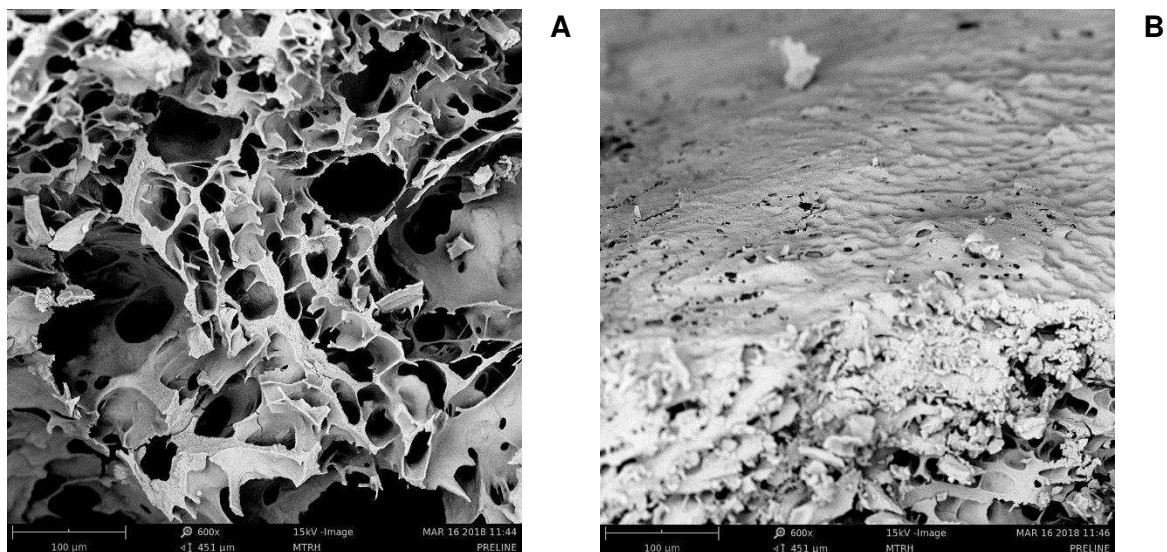
#### **4.3.2. Obtención de imágenes de macrocápsulas mediante microscopía electrónica de barrido**

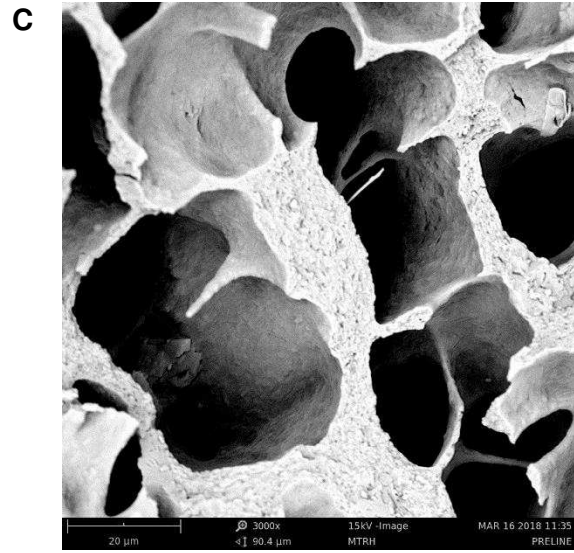
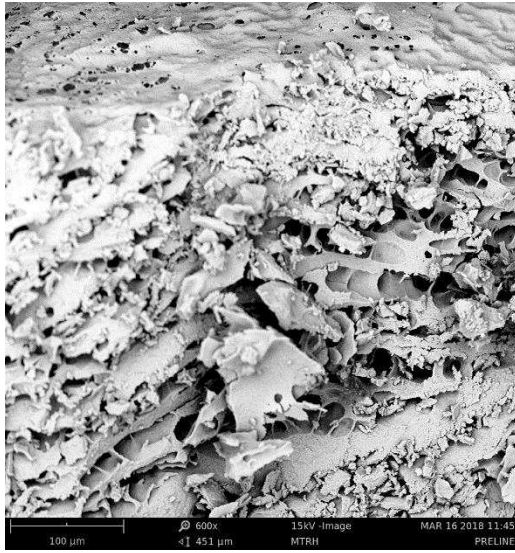
Cortes de las macrocápsulas G:A7,5PS 9:1 se presentan en la Figura 9. Se puede observar la estructura interna de las macrocápsulas en la que se aprecia el interior con espacios vacíos de diferente tamaño (Figura 12 A). La estructura interna es compacta y se puede ver la estrecha

interacción de la matriz con el inóculo (Figura 12 D). En las imágenes se puede observar a los microorganismos tanto en el interior como en el exterior de las trabéculas (Figura 12 E). En la superficie externa de la macrocápsula se pueden ver los microorganismos, esto es característico de la encapsulación de tipo matriz, donde los mismos están no solamente en el núcleo, sino también en la superficie de la macrocápsula (Figura 12 F). Se puede observar también la formación de aberturas en algunas partes de la superficie externa de las macrocápsulas (Figura 12 B).

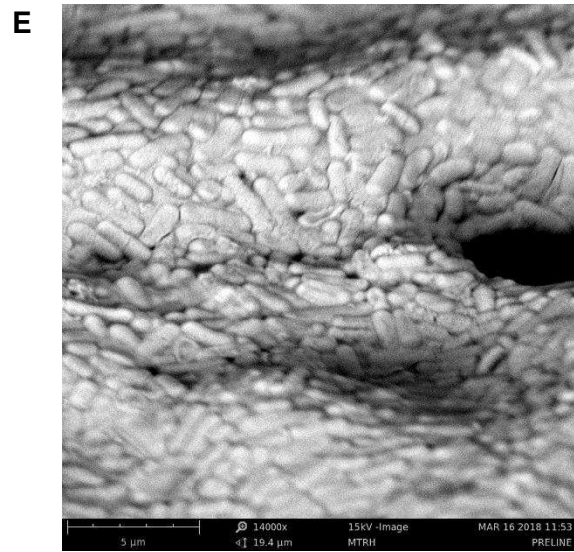
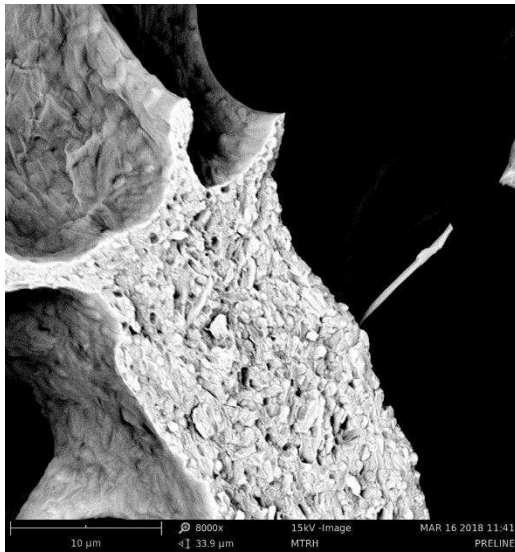
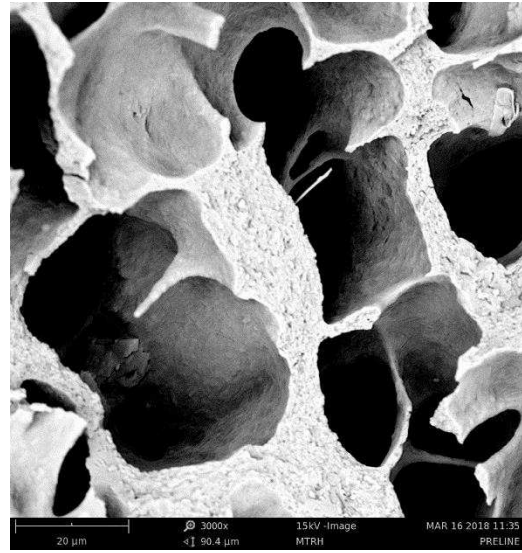
Cortes de macrocápsulas con matriz G:A20PS9:1 se presentan en la figura 13. Al igual que en la macrocápsula G:A7,5PS 9:1, se puede ver la formación de un trabeculado interno con espacios vacíos de diferente tamaño (Figura 13 B). En la misma figura se puede observar los microorganismos mezclados con la matriz. Un corte de la macrocápsula en la que se observa la superficie externa e interna se presenta en la figura 13 A. En la superficie externa de la macrocápsula, se puede ver la interacción de la matriz con los microorganismos (Figura 13 C). En la figura 13 D. se pueden ver los microorganismos con mayor aumento en la superficie de la macrocápsula.

**Figura 12.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de diferentes cortes de macrocápsulas de G:A 7,5PS 9:1 transportadoras de *L. reuteri* DSPV002





D

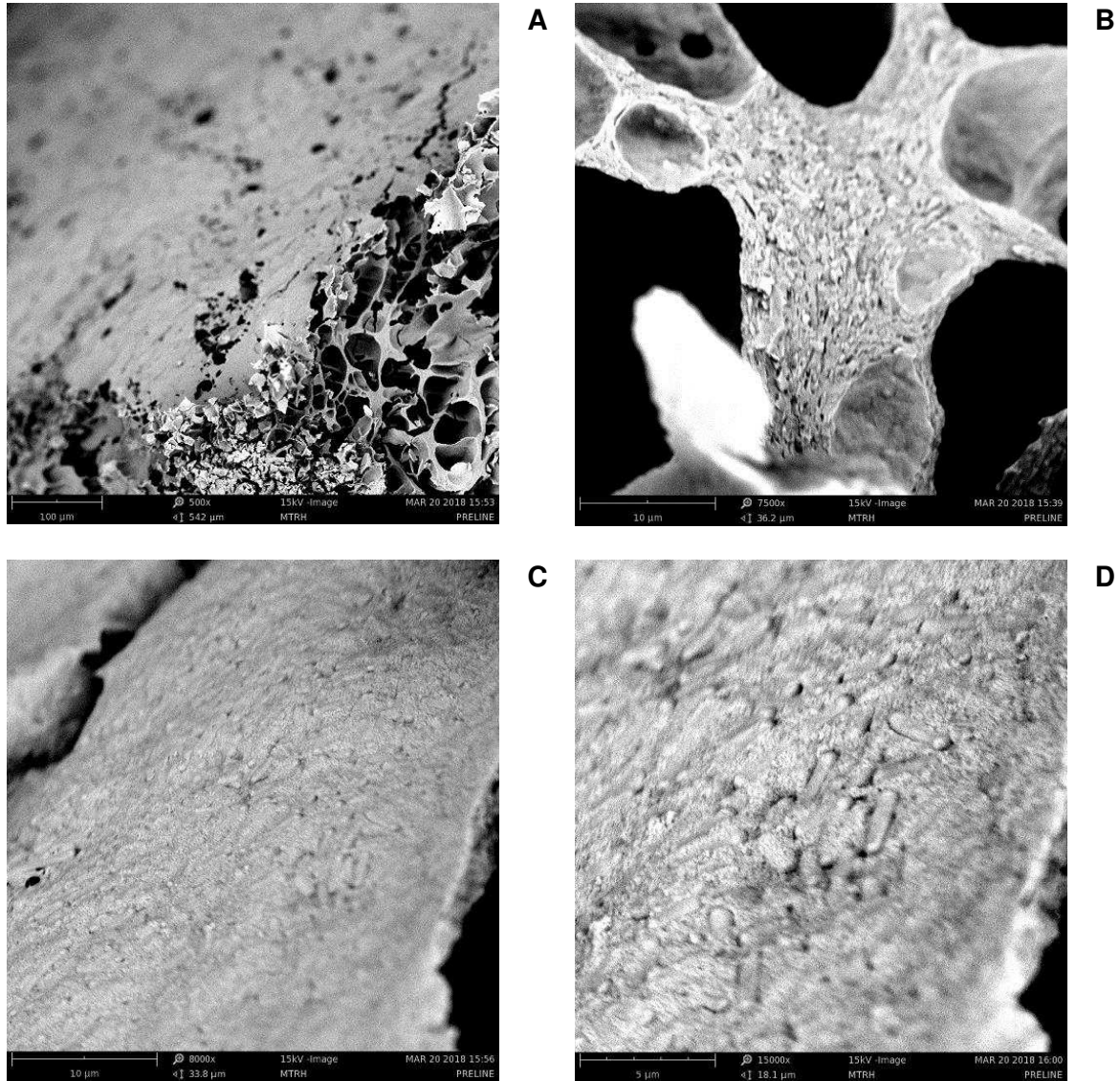


F

**A.** Interior de la macrocápsula (600X). **B y C.** Cortes con superficie externa e interior de la macrocápsula (600X). **D.** Corte interior de la macrocápsula (3000X). **E.** Corte interior de la macrocápsula (8000X). **F.** Exterior de la macrocápsula (14000X).



**Figura 13.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de diferentes cortes de macrocápsulas G:A20PS 9:1 transportadoras de *L. reuteri* DSPV002



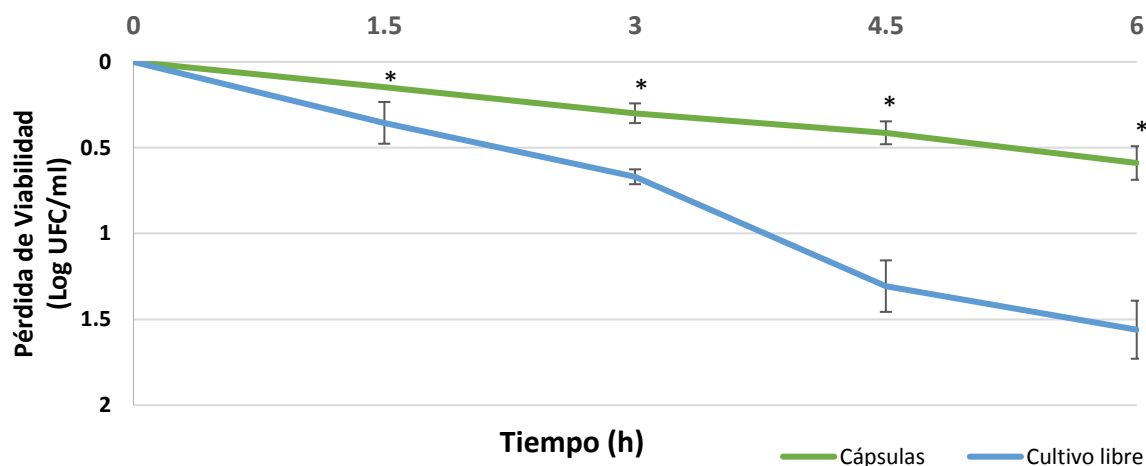
**A.** Cortes con superficie externa e interior de la macrocápsula (500X). **B.** Corte interior de la macrocápsula (7500X). **C.** Exterior de la macrocápsula (8000X). **D.** Exterior de la macrocápsula (15000X).

#### **4.4. Evaluación de la viabilidad bacteriana dentro de las macrocápsulas en condiciones gastrointestinales simuladas**

#### 4.4.1. Determinación de la viabilidad mediante recuento en placa

La pérdida de viabilidad de *L. reuteri* DSPV002C fue menor en las macrocápsulas que en forma de cultivo libre a lo largo de todo el ensayo ( $P > 0,001$ : Figura 14). En el tiempo 0, los recuentos fueron de  $10,68 \pm 0,05$  Log UFC/ml para las macrocápsulas y  $9,18 \pm 0,08$  Log UFC/ml para el cultivo libre. Luego de 1,5 h de incubación en JG, las macrocápsulas tuvieron una pérdida de  $0,14 \pm 0,01$  Log UFC/ml y el cultivo libre  $0,35 \pm 0,12$  Log UFC/ml con porcentaje de supervivencia del 71,3% y 45,3% respectivamente. A las 3 h de incubación, la pérdida de viabilidad fue menor para las macrocápsulas ( $p = 0,019$ ), con  $0,29 \pm 0,05$  Log UFC/ml y una supervivencia del 50,53% frente a  $0,66 \pm 0,04$  Log UFC/ml para el cultivo libre, con una supervivencia del 22,39% (Figura 14). A las 4,5 h y luego de una incubación de 1,5 h en JI, la pérdida de viabilidad acumulada fue de  $0,41 \pm 0,06$  Log UFC/ml en las macrocápsulas y  $1,30 \pm 0,15$  Log UFC/ml para el cultivo libre ( $P > 0,001$ ). Esto se corresponde con una supervivencia del 39,17% para las macrocápsulas y del 5% para el cultivo libre. Finalmente, luego de 6 h de incubación, la pérdida de viabilidad total de las macrocápsulas fue de  $0,58 \pm 0,09$  Log UFC/ml frente a  $1,56 \pm 0,16$  Log UFC/ml del cultivo libre. El porcentaje de supervivencia de los microorganismos encapsulados fue del 26,53% y del cultivo libre fue del 2,85% (Figura 14).

**Figura 14.** Pérdida de viabilidad de *L. reuteri* DSPV002C encapsulada en G:A7,5 PS 9:1 y sin encapsular (cultivo libre), en condiciones gastrointestinales simuladas durante 6 h, evaluada mediante recuento en placa.



La macrocápsula G:A 7,5PS 9:1 liofilizada estaba conformada por gelatina 5% p/v + almidón 2,5% p/v, más la adición de permeado de suero al 10% como crioprotector. \* significa diferencias

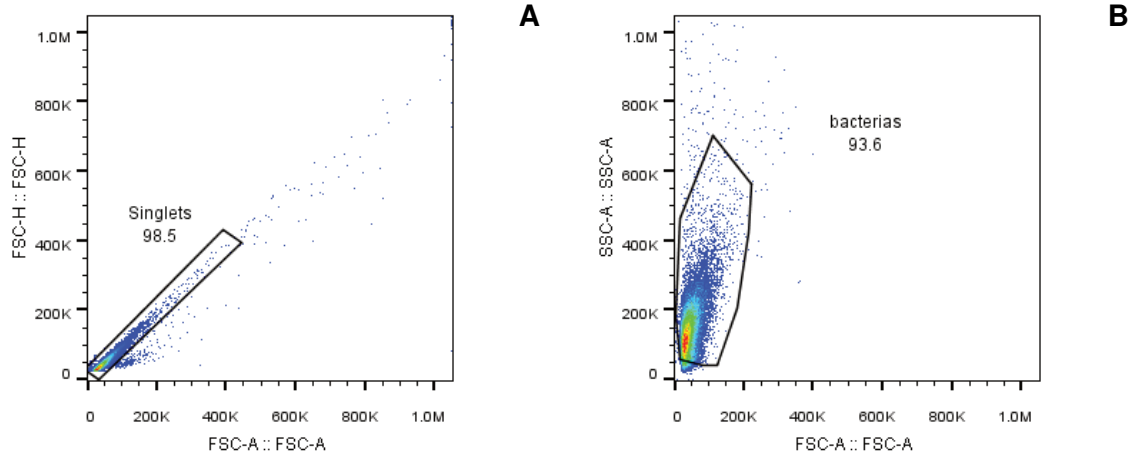
entre grupos para un mismo tiempo. Los recuentos se muestran como la media  $\pm$  el desvío estándar.

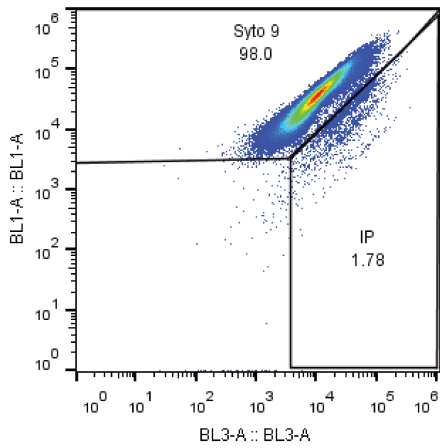
#### 4.4.2. Determinación de la viabilidad mediante citometría de flujo

Para poder determinar el porcentaje de eventos positivos para Syto9 y Ioduro de propidio (IP), se realizó una curva de calibración (Figura 15).

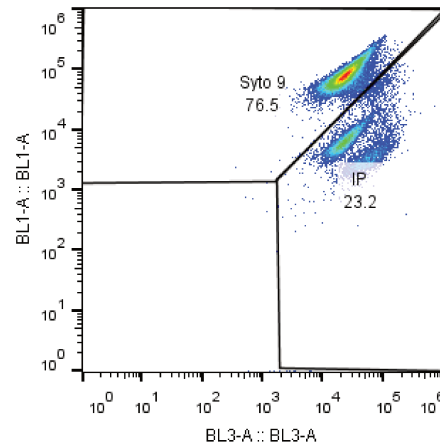
A través del análisis de viabilidad mediante citometría de flujo, se pudieron identificar 2 poblaciones celulares, tanto en microorganismos encapsulados como en forma de cultivo libre. Las células vivas toman el fluorocromo Syto9 y se observan en el cuadrante superior del gráfico dot plot BL1 vs. BL3, y las células muertas o con daños en membrana celular toman el fluorocromo IP, y se observan en el cuadrante derecho del mismo gráfico (Figura 15).

**Figura 15.** Curva de calibración para determinar el porcentaje de eventos positivos para Syto9 e IP mediante citometría de flujo utilizando diferentes combinaciones de poblaciones vivas y muertas de *L. reuteri* DSPV002C.

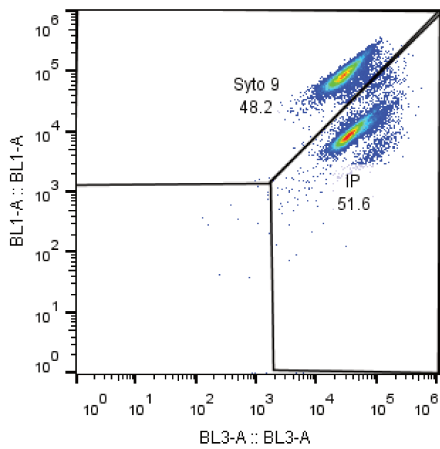




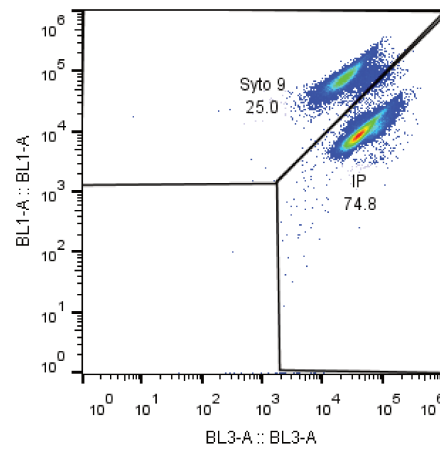
C



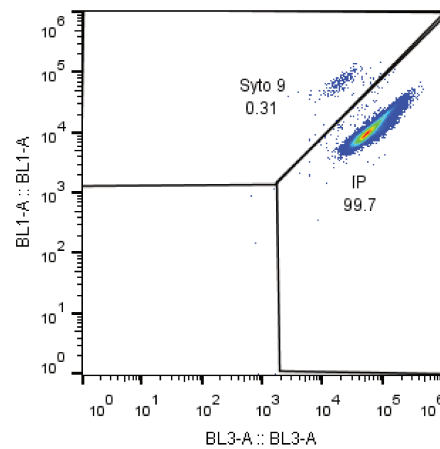
D



E



F

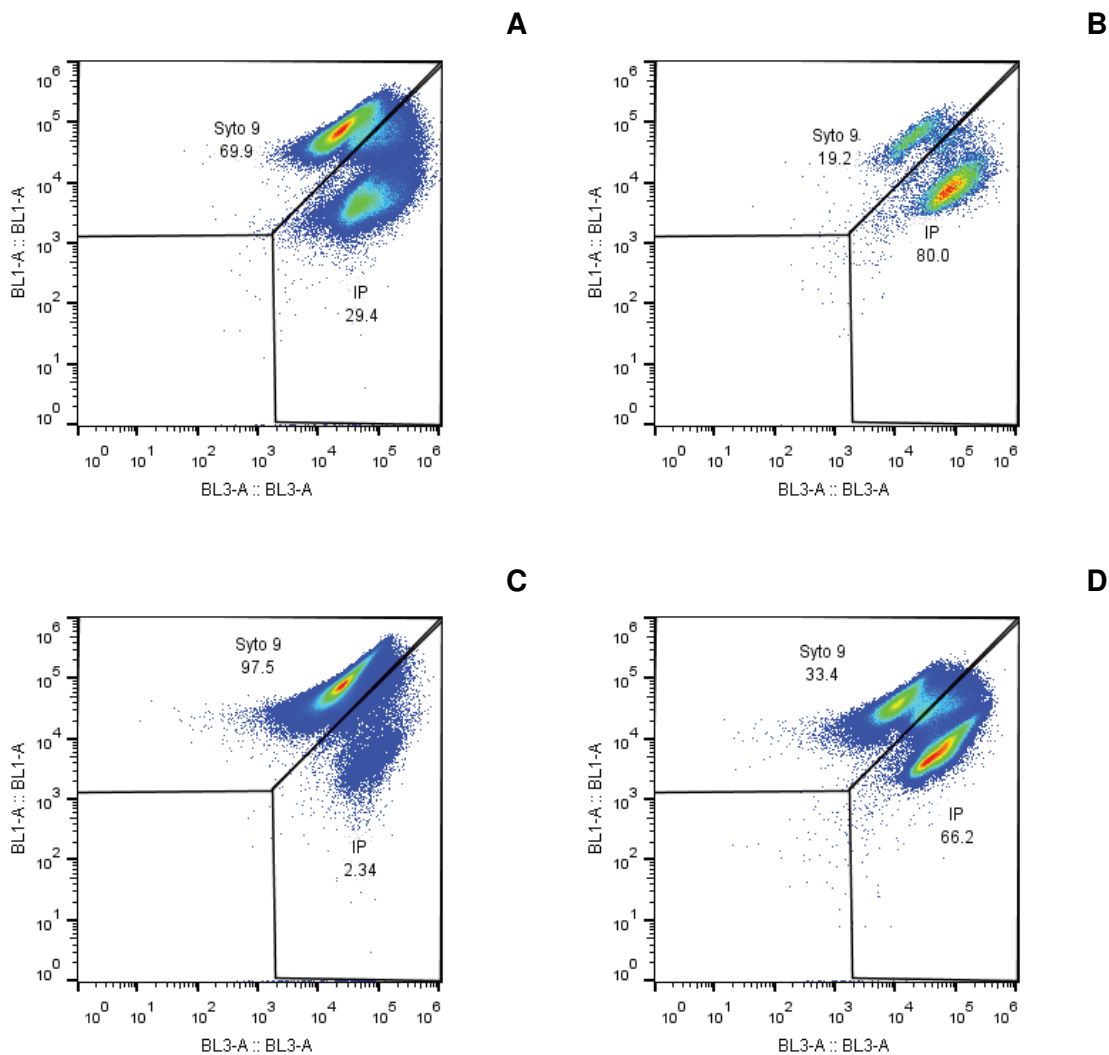


G

Gráficos Dot Plot representativos que muestran las diferentes proporciones de células vivas en BL1 (verdes, teñidas con Syto9) y muertas en BL3 (rojas, teñidas con IP). **A.** Gráfico Dot Plot de altura (FSC-H) vs. área (FSC-A) para la selección de “singletes” o células únicas. **B.** Gráfico de Complejidad citoplasmática (SSC) vs. Tamaño (FSC) que muestra la región donde se encuentra

la población celular a evaluar. Gráficos Dot Plot representativos de BL1 (bacterias vivas teñidas con Syto9) vs. BL3 (bacterias muertas teñidas con IP) correspondientes a la curva de calibración: **C-** Gráfico Dot Plot mostrando el valor experimental encontrado para un 100% teórico de células vivas. **D.** 75% de células vivas. **E.** 50% de células vivas. **F.** 25% de células vivas. **G.** 0% de células vivas.

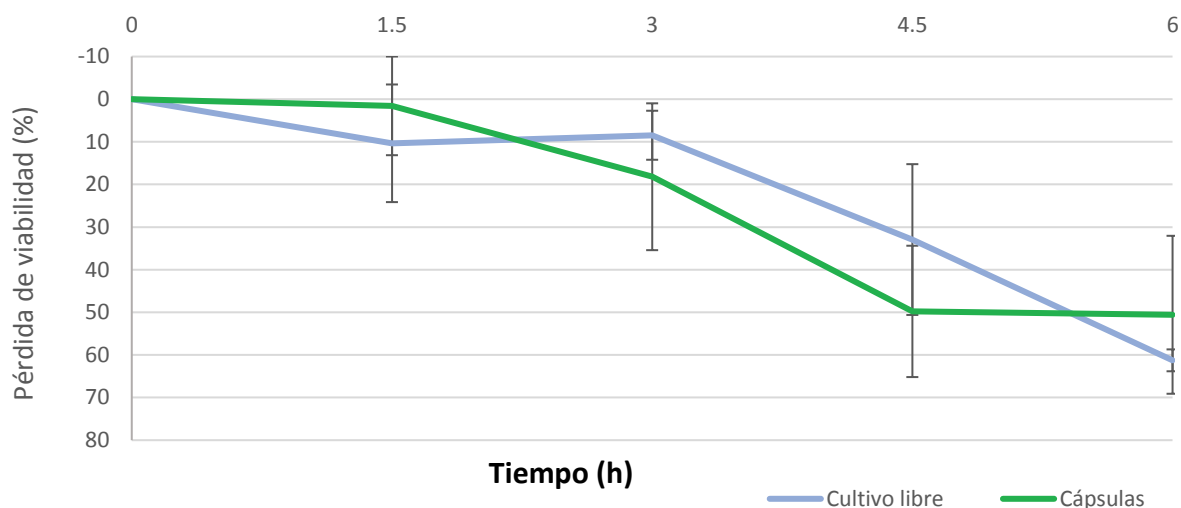
**Figura 16.** Viabilidad de *L. reuteri* DSPV002C en macrocápsulas y en cultivo libre frente a condiciones gastrointestinales simuladas.



Gráficos Dot Plot representativos que muestran los porcentajes de células vivas y muertas, en macrocápsulas y cultivo libre frente a condiciones gastrointestinales simuladas durante 6 h. **A.** Macrocápsula 0 h. **B.** Macrocápsula 6 h. **C.** Cultivo libre 0 h. **D.** Cultivo libre 6 h.

El porcentaje de microorganismos vivos en las condiciones gastrointestinales simuladas fue similar en el cultivo libre y en las macrocápsulas ( $P>0,05$ ) (Figura 17). A las 3 h las macrocápsulas perdieron  $18\pm 17,22\%$  de viabilidad mientras que el cultivo libre perdió un  $8\pm 5,74\%$  comparando ambos frente al tiempo 0. Por otra parte, luego de 6 h de incubación, las macrocápsulas mostraron una pérdida de viabilidad del  $50\pm 18,52\%$  y el cultivo libre disminuyó su viabilidad un  $61\pm 2,56\%$ .

**Figura 17.** Pérdida de viabilidad (%) de *L. reuteri* DSPV002C encapsulada en G:A7,5PS 9:1 y sin encapsular (cultivo libre), en condiciones gastrointestinales simuladas durante 6 h, evaluada mediante citometría de flujo.



Porcentaje de bacterias vivas del inóculo probiótico encapsulado y liofilizado (macrocápsulas) y sin encapsular (Cultivo libre) en el tiempo. Macroscápsulas G:A7,5PS 9:1: liofilizadas conformadas por gelatina 10% + almidón 5% más la adición de permeado de suero de queso al 10% como crioprotectores. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. Letras distintas significan diferencias en el recuento a través del tiempo dentro de cada grupo ( $p<0,05$ ).

#### 4.5. Determinación de la viabilidad bacteriana en las macrocápsulas adicionadas al alimento peletizado

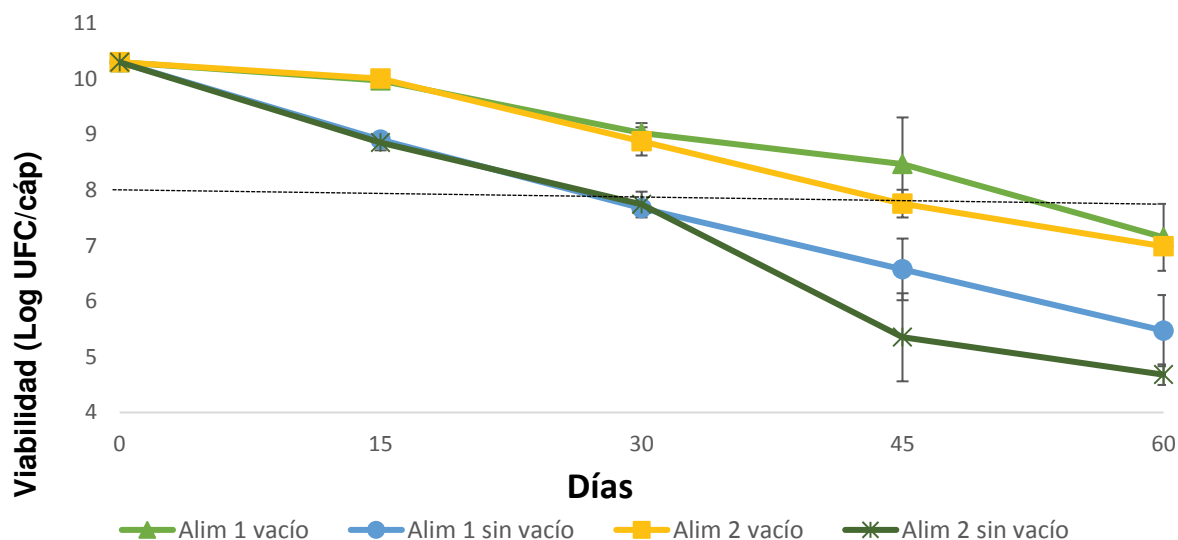
Se encontraron diferencias en la viabilidad de las macrocápsulas en las condiciones de atmósfera y en el alimento utilizado. La viabilidad de las macrocápsulas envasadas al vacío fue mejor a lo largo del tiempo en comparación a las macrocápsulas envasadas sin vacío ( $P<0,001$ ). Las

macrocápsulas almacenadas con el alimento 1, presentaron una mayor viabilidad en el tiempo que las almacenadas con el alimento 2 ( $P=0,002$ )

En el día 0, las macrocápsulas tuvieron una viabilidad de  $10,30 \pm 0,06$  Log UFC/cáp. Luego de 60 días de almacenamiento en temperatura ambiente, las macrocápsulas almacenadas con el alimento 1 y envasadas en vacío, presentaron una viabilidad de  $7,15 \pm 0,60$  Log UFC/cáp, con una pérdida de 3,14 Log (Figura 18). Las macrocápsulas almacenadas con el alimento 1 y no envasadas en vacío, perdieron 4,83 Log en los 60 días, con  $5,47 \pm 0,64$  Log UFC/cáp.

Para las macrocápsulas almacenadas con el alimento 2, la viabilidad de las macrocápsulas almacenadas en vacío fue de  $6,98 \pm 0,05$  Log UFC/cáp a los 60 días (pérdida de 3,32 Log). Las macrocápsulas con el mismo alimento, y almacenadas sin vacío perdieron 5,62 Log con  $4,68 \pm 0,18$  Log UFC/cáp al finalizar el ensayo.

**Figura 18.** Viabilidad en el tiempo de *L. reuteri* DSPV002C en macrocápsulas G:A7,5PS 9:1 adicionadas en alimentos peletizados para lechones de recría en fase 1 conservadas a temperatura ambiente en diferentes atmósferas.



G:A 7,5PS 9:1: macrocápsula compuesta por gelatina 5% + almidón 2,5% con permeado de suero al 10% como crioprotector, en Alimento 1 (Alim 1) y Alimento 2 (Alim 2), envasado al vacío (vacío) y sin vacío (sin vacío). La línea negra punteada marca la DMR. Los recuentos se muestran como la media  $\pm$  el desvío estándar

Con un consumo mínimo de 500 gr de alimento/animal/d durante la recría, son necesarias incluir 50 cáp/bolsa para mantener la DMR de  $10^8$  UFC entre los 0 y 15 d de almacenamiento. Si el alimento es envasado con vacío, este número de macrocápsulas se mantiene hasta los 30 d (Tabla 13). Si el alimento es envasado sin vacío, es necesario incluir 150 macrocápsulas en el alimento 1 y 100 macrocápsulas en el alimento 2 para que se mantenga la DMR hasta a los 30 d de almacenamiento. Para que los animales reciban una DMR por ración de alimento hasta los 60 d, teniendo en cuenta un consumo mínimo de 500g/animal/d, es necesario incluir 200 cáp/bolsa para el alimento 1 y 550 cáp/bolsa para el alimento 2 si estos son envasados al vacío. Si los alimentos no son envasados en vacío, es necesario incluir 9900 cáp/bolsa y 98700 cáp/bolsa en los alimentos 1 y 2 respectivamente.

**Tabla 13.** Número de macrocápsulas a incluir cada 0,5 kg o por bolsa de 25 kg de alimento para asegurar el consumo de al menos la DMR ( $10^8$  UFC/d) por animal, teniendo en cuenta la pérdida de viabilidad en el tiempo.

Días de almacenamiento	Alimento 1				Alimento 2			
	Numero de macrocápsulas por bolsa de alimento		Numero de macrocápsulas por animal/d		Numero de macrocápsulas por bolsa de alimento		Numero de macrocápsulas por animal/d	
	Envasado en vacío	No envasado en vacío	Envasado en vacío	No envasado en vacío	Envasado en vacío	No envasado al vacío	Envasado en vacío	No envasado al vacío
0	50	50	1	1	50	50	1	1
15	50	50	1	1	50	50	1	1
30	50	150	1	3	50	100	1	2
45	50	900	1	18	100	11150	2	223
60	200	9900	4	198	550	98700	11	1974

Número de macrocápsulas por bolsa de alimento considerando una bolsa de 25 kg. Número de macrocápsulas por animal considerando un consumo mínimo de 500 g/d.

#### **4.6. Verificación de la eficiencia del método de conservación mediante un ensayo *in vivo* en cerdos**

Se realizó un estudio *in vivo* con lechones destetados para verificar el método de conservación y la administración del inóculo encapsulado. Las actividades incluidas en el ensayo fueron: análisis



microbiológico a partir de materia fecal, hemograma completo, bioquímica sanguínea, medición de parámetros de rendimiento productivo y sanitario e histomorfología de intestino delgado de los lechones.

#### 4.6.1. Análisis microbiológicos en muestras de materia fecal

En la tabla 14 se pueden ver los recuentos de las diferentes poblaciones microbianas evaluadas a partir de la materia fecal de los lechones. Se observó ausencia de la cepa *L. reuteri* DSPV002C al inicio del ensayo (semana 0) en ambos grupos de estudios. La recuperación de *L. reuteri* DSPV 002C en lechones del GP se observó desde la segunda hasta la última semana de ensayo, con recuentos  $\geq 3,72$  Log UFC/g de materia fecal. En el grupo control no se recuperó la cepa administrada en ninguna de las semanas del ensayo.

**Tabla 14.** Recuentos de poblaciones microbianas en la materia fecal de los lechones.

Microorganismos	Recuento (Log UFC/g)							
	0d	7d	14d	21d	28d	35d	42d	P
<b>BAL</b>								
GC	7,65±0,5 <sup>a</sup>	8,23±0,6 <sup>a</sup>	7,86±0,5 <sup>a</sup>	8,11±0,4 <sup>a</sup>	8,55±0,4 <sup>a</sup>	8,58±0,8 <sup>a</sup>	7,62±1,8 <sup>a</sup>	0,95
GP	7,56±0,8 <sup>a</sup>	8,31±0,6 <sup>a</sup>	8,19±0,4 <sup>a</sup>	7,68±0,8 <sup>a</sup>	8,44±0,5 <sup>a</sup>	8,31±0,5 <sup>a</sup>	8,20±0,6 <sup>a</sup>	
<b><i>L. reuteri</i> DSPV 002C</b>								
GC	< LD							
GP	< LD	4,25±1,1 <sup>a</sup>	3,72±0,7 <sup>a</sup>	4,10±0,5 <sup>a</sup>	5,96±1,1 <sup>a</sup>	5,58±1,1 <sup>a</sup>	5,39±0,6 <sup>a</sup>	
<b><i>Campylobacter</i> spp.</b>								
GC	6,53±0,5 <sup>a</sup>	5,15±1,3 <sup>a</sup>	4,41±0,7 <sup>a</sup>	3,10±0,2 <sup>a</sup>	3,52±0,4 <sup>a</sup>	4,10±0,9 <sup>a</sup>	3,44±1,1 <sup>a</sup>	0,58
GP	7,18±0,6 <sup>a</sup>	4,65±0,8 <sup>a</sup>	4,62±0,8 <sup>a</sup>	3,62±0,8 <sup>a</sup>	3,16±0,9 <sup>a</sup>	3,39±1,2 <sup>a</sup>	2,99±1,1 <sup>a</sup>	
<b><i>Escherichia coli</i></b>								
GC	7,48±0,8 <sup>Aa</sup>	6,37±1,1 <sup>a</sup>	4,96±1,2 <sup>a</sup>	3,02±1,0 <sup>a</sup>	5,18±1,0 <sup>a</sup>	4,32±1,0 <sup>a</sup>	3,82±1,2 <sup>Aa</sup>	0,17
GP	8,4±0,5 <sup>Ba</sup>	7,03±0,9 <sup>a</sup>	5,09±1,4 <sup>a</sup>	3,04±1,5 <sup>a</sup>	4,16±1,0 <sup>a</sup>	4,20±1,4 <sup>a</sup>	5,54±0,8 <sup>Ba</sup>	
<b>Levaduras</b>								
GC	4,34±0,4 <sup>a</sup>	5,42±0,4 <sup>a</sup>	3,83±0,5 <sup>a</sup>	2,55±0,9 <sup>a</sup>	2,98±0,5 <sup>a</sup>	2,54±0,7 <sup>a</sup>	2,43±0,4 <sup>Aa</sup>	0,42
GP	3,85±1,0 <sup>a</sup>	4,62±0,8 <sup>a</sup>	3,00±1,3 <sup>a</sup>	2,92±0,9 <sup>a</sup>	3,01±0,9 <sup>a</sup>	2,50±0,8 <sup>a</sup>	3,08±0,6 <sup>Ba</sup>	

GC: grupo control. GP: grupo probiótico. Los datos se expresan en Log UFC/g de materia fecal y corresponden a la media  $\pm$  el desvío estándar. LD: límite de detección >100 UFC/g. Las letras A y B mayúsculas corresponden a diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre grupos para ese

momento. Las letras a y b minúsculas corresponden a diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) dentro de cada grupo.

Los recuentos de BAL (Tabla 15) no se vieron afectados por la administración de la cepa *L. reuteri* DSPV 002C ( $P > 0,05$ ) a lo largo del ensayo. No se encontraron diferencias entre los grupos para cada semana particular. Finalmente, el análisis dentro de un mismo grupo experimental, tampoco arrojó diferencias entre las semanas ( $P > 0,05$ ). Se encontró la presencia de la cepa *L. reuteri* DSPV002C, a partir de su momento de detección, el d 7 del ensayo, solamente en el GP (tabla 15).

Los valores de *E. coli* fueron similares entre los lechones del GC y del GP ( $p = 0,174$ ) (tabla 15). En el d 0, el GP presentó mayores recuentos que el GC ( $P = 0,041$ ). Lo mismo ocurrió el d 42, con mayores recuentos en el GP ( $P = 0,014$ ). El análisis dentro de un mismo grupo experimental, no mostró diferencias entre las semanas para ninguno de los grupos ( $P > 0,05$ ).

No se encontraron diferencias en el recuento de levaduras entre GC y GP ( $P = 0,42$ ). En el análisis por semana, los recuentos fueron mayores en GP que en GC en el d 42 del ensayo ( $P = 0,044$ ). El GC mostró una tendencia ( $P = 0,051$ ) a tener mayores recuentos que el GP en el d 7 del ensayo. Dentro del GP, los recuentos de esta población microbiana no mostraron diferencias entre semanas. El GC tampoco tuvo variaciones en los recuentos entre las distintas semanas.

Los recuentos de *Campylobacter* spp. no presentaron diferencias entre GC y GP ( $P = 0,585$ ). Tampoco se encontraron diferencias dentro de cada grupo entre las diferentes semanas de muestreo.

Los recuentos de las poblaciones de BAL, *E. coli*, *Campylobacter* spp. y levaduras permitieron determinar la relación entre estas poblaciones microbianas. En la tabla 15 se presentan las relaciones entre las BAL y las demás poblaciones de microorganismos.

**Tabla 15.** Relación entre las poblaciones de microorganismos fecales en lechones durante la recría.

	Tiempo (d)							p
	0	7	14	21	28	35	42	
<b>BAL/<i>E. coli</i></b>								
GC	1,03±0,1 <sup>a</sup>	1,34±0,3 <sup>a</sup>	1,64±0,3 <sup>a</sup>	2,93±0,9 <sup>a</sup>	1,72±0,4 <sup>a</sup>	2,1±0,6 <sup>a</sup>	2,22±1,1 <sup>a</sup>	0,711
GP	0,91±0,1 <sup>a</sup>	1,19±0,1 <sup>a</sup>	1,69±0,3 <sup>a</sup>	3,03±1,2 <sup>a</sup>	2,11±0,4 <sup>a</sup>	2,21±0,8 <sup>a</sup>	1,5±0,2 <sup>a</sup>	
<b>BAL/levaduras</b>								
GC	1,79±0,3 <sup>a</sup>	1,52±0,1 <sup>a</sup>	2,1±0,4 <sup>Aa</sup>	3,48±1,0 <sup>a</sup>	2,95±0,5 <sup>a</sup>	3,57±0,9 <sup>a</sup>	3,25±1,0 <sup>a</sup>	0,747
GP	2,05±0,4 <sup>a</sup>	1,87±0,4 <sup>a</sup>	3,01±0,8 <sup>Ba</sup>	2,86±1,0 <sup>a</sup>	2,99±0,7 <sup>a</sup>	3,54±0,7 <sup>a</sup>	2,76±0,6 <sup>a</sup>	
<b>BAL/<i>Campylobacter</i> spp.</b>								
GC	1,18±0,1 <sup>a</sup>	1,68±0,3 <sup>a</sup>	1,82±0,3 <sup>a</sup>	2,63±0,2 <sup>Aa</sup>	2,46±0,3 <sup>a</sup>	2,21±0,6 <sup>a</sup>	2,58±1,4 <sup>a</sup>	0,220
GP	1,07±0,1 <sup>a</sup>	1,83±0,3 <sup>a</sup>	1,82±0,3 <sup>a</sup>	2,18±0,4 <sup>Ba</sup>	2,89±0,9 <sup>a</sup>	2,73±1,0 <sup>a</sup>	3,14±1,3 <sup>a</sup>	

GC: grupo control; GP: grupo probiótico. BAL: bacterias ácido lácticas. Los valores están expresados como el promedio  $\pm$  el desvío estándar. Letras mayúsculas significan que hay diferencias entre los grupos para un mismo momento. Letras minúsculas iguales significa que no hay diferencia dentro del mismo grupo ( $P < 0,05$ ).

El resultado obtenido a partir del análisis de la relación BAL/*E. coli* no mostró diferencias ( $p=0,711$ ) entre el GC y el GP. La relación BAL/*E. coli* se encontró entre 1,03±0,1 y 2,93±0,9 para el GC; para el GP fue entre 0,91±0,1 y 3,03±1,2. El análisis dentro de cada grupo, no mostró diferencias entre las semanas.

En la relación BAL/levaduras no se encontraron diferencias entre los grupos (0,747). El d 14, se encontró una relación mayor en el GP ( $P=0,04$ ). La relación en el GC se encontró entre 1,79±0,3 y 3,57±0,9; para el GP fue entre 1,87±0,4 y 3,54±0,7. El análisis dentro de cada grupo, no mostró diferencias entre las semanas.

Para la relación BAL/*Campylobacter* spp. tampoco se encontraron diferencias entre los grupos ( $P=0,220$ ). La relación se encontró entre 1,18±0,1 y 2,63±0,2 para el GC; en el GP, la relación fue entre 1,07±0,1 y 3,14±1,3. El análisis mostró diferencias en el d 21, con una relación mayor para el GC ( $P=0,049$ ).

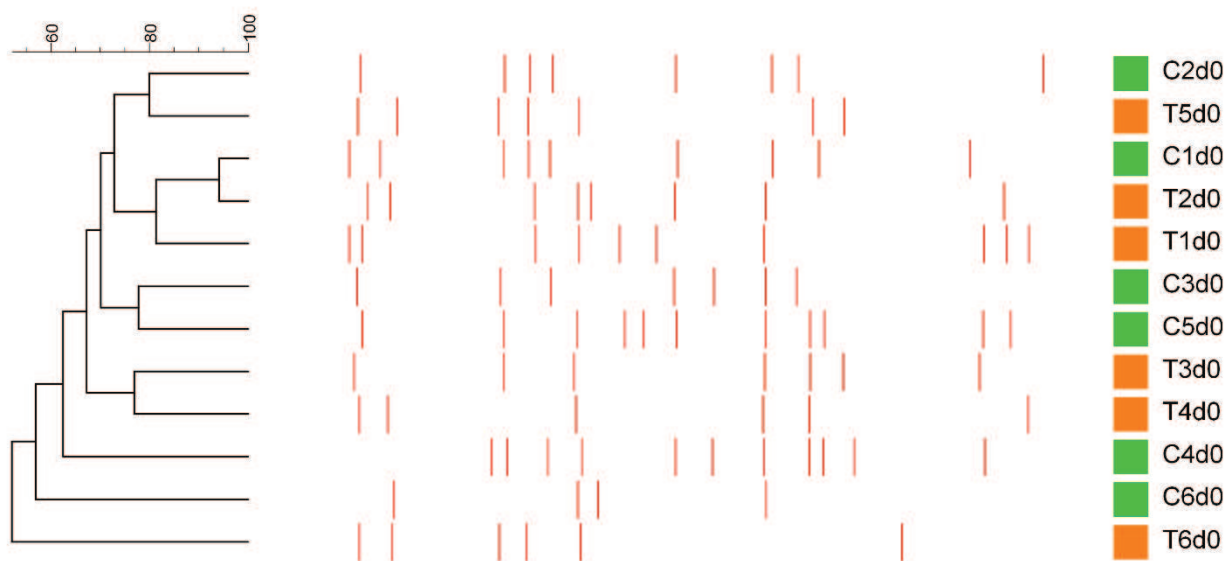
#### 4.6.2. Análisis de la dinámica poblacional de la microbiota predominante mediante DGGE

#### 4.6.2.1. Análisis de los geles

Los patrones de DGGE obtenidos presentaron entre 3 y 11 bandas por calle. El d 0 presentó la mayor cantidad de bandas, seguido por el d 42 y el d 21.

En el dendrograma del d 0 no se observaron agrupamientos que formen clusters principales. Se presentaron 94 bandas discernibles. Se encontraron entre 4 y 11 bandas por calle. En la figura 19 se presenta el dendrograma con los perfiles del d 0.

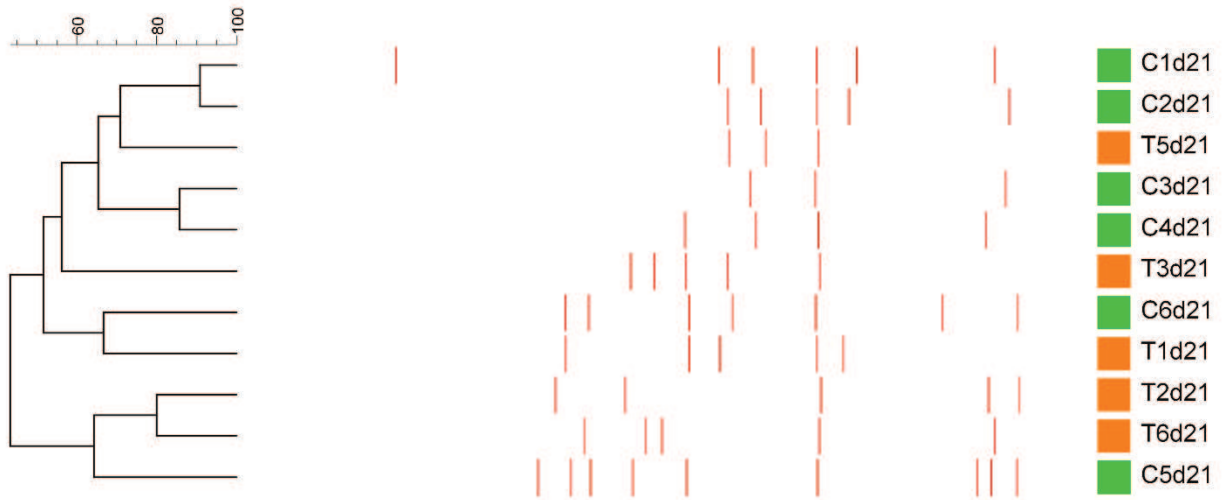
**Figura 19.** Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los lechones al d 0.



Verde C: lechones grupo control, C1 a C6. Naranja T: lechones grupo probiótico, T1 a T6. Día 0 (d0).

En el d21, se formaron 2 clusters principales con una similitud de 44%. El primero de estos incluyó 2 perfiles de GP y 1 perfil de GC. El otro se dividió en 2 clusters con un 52% de similitud. Uno de estos clusters incluyó 4 perfiles de GC y 2 perfiles de GP, mientras que el otro cluster incluyó 1 perfil de cada grupo. Se observó un total de 57 bandas, con calles de entre 3 y 9 bandas. En la figura 20 se presenta el dendrograma con los perfiles del d 21.

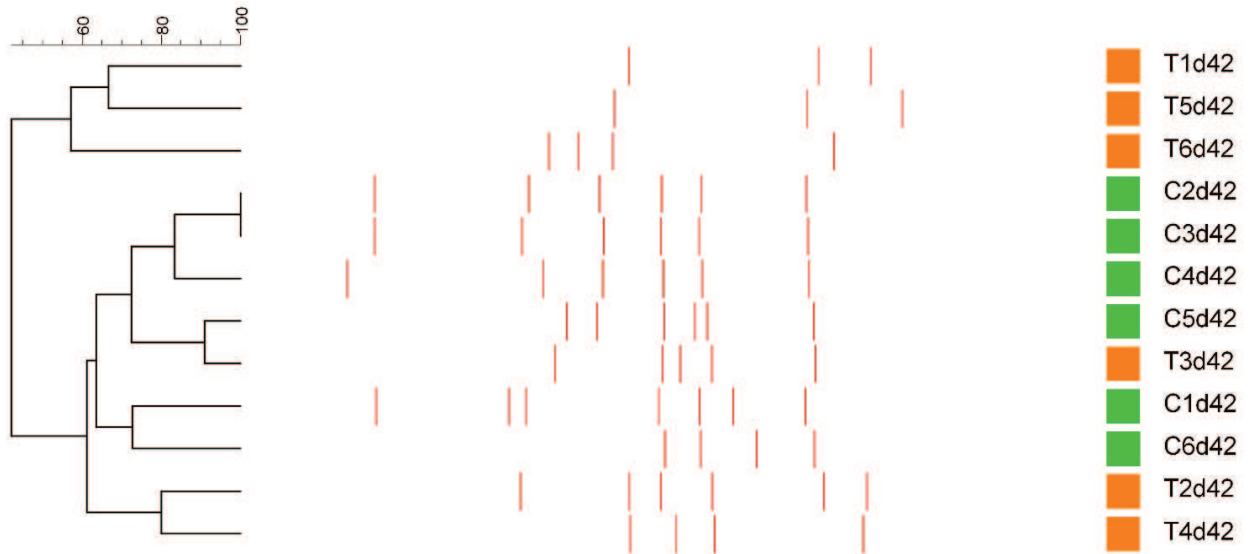
**Figura 20.** Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los lechones al d 21.



Verde C: lechones grupo control, C1 a C6. Naranja T: lechones grupo probiótico, T1 a T6. Día 21 (d21).

El d 42 se observó una similitud del 49% de los perfiles bacterianos. Se formaron 2 clusters, uno con el 57% de similitud y otro con 72%. El cluster del 57% estaba conformado por perfiles de 3 lechones del GP. A la vez, el cluster de 72% de similitud, se dividió en 2 clusters, uno con 76% de similitud, conformado por perfiles del GC y GP, y otro con 78% de similitud, conformado solamente por GC. Se presentaron un total de 60 bandas, con calles de 3 a 7 bandas cada una. En la figura 21 se presenta el dendrograma con los perfiles del d 42.

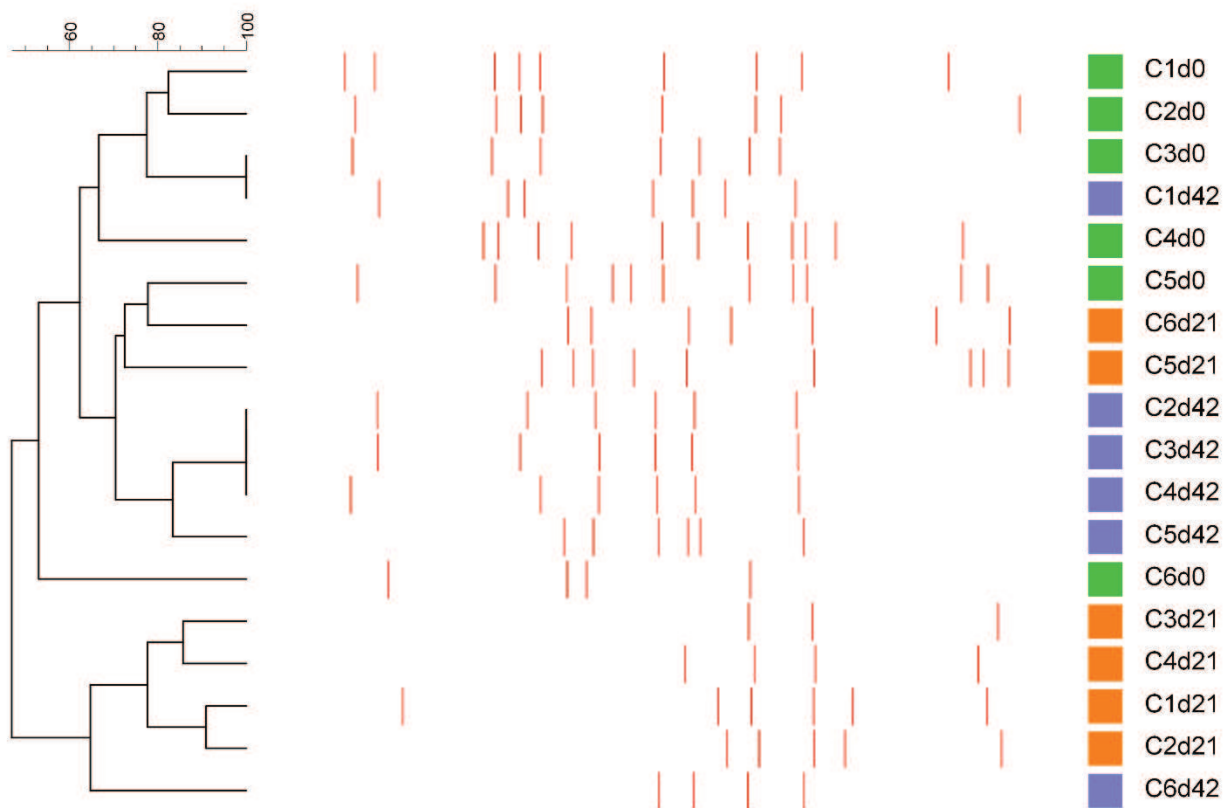
**Figura 21.** Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los lechones al d 42.



Verde C: lechones grupo control, C1 a C6. Naranja T: lechones grupo probiótico, T1 a T6. Día 42 (d42).

El dendrograma en el que se analiza solamente el grupo control, a lo largo de todo el experimento, mostró una similitud del 47% entre todos los perfiles. Se observó la formación de 2 clusters principales, uno con 53% de similitud y otro con 66%. El primero estaba formado por 4 perfiles del d 21 y 1 del d 42. El segundo incluyó perfiles de los 3 d. La figura 22 muestra el dendrograma de los perfiles de todos los controles.

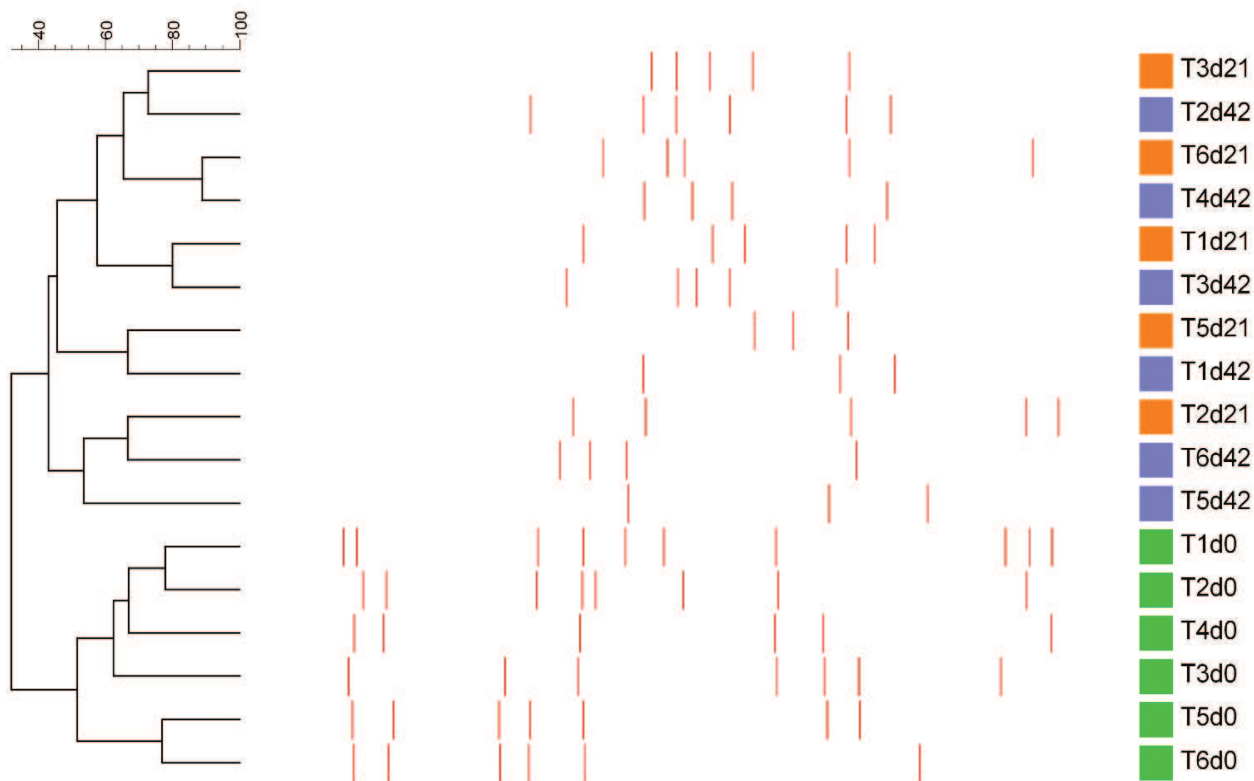
**Figura 22.** Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los lechones del grupo control, días 0, 21 y 42 del ensayo.



Verde C: lechones grupo control, C1 a C6 día 0 (d0). Naranja C: lechones grupo probiótico, C1 a C6 día 21 (d21). Lila C: lechones grupo control, C1 a C6 día 42 (d42).

El dendrograma de todos los perfiles de lechones tratados, mostró una similitud del 37%. Se formaron 2 clusters principales, uno con el 58% de similitud que incluía a los perfiles del d 0 y otro con el 51% que a la vez se dividió en 2, con 53% y 54% de similitud respectivamente y con perfiles del d 21 y del d42 en ambos. La figura 23 muestra el dendrograma de los perfiles de todos los pertenecientes al GP.

**Figura 23.** Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los lechones del grupo probiótico, días 0, 21 y 42 del ensayo.

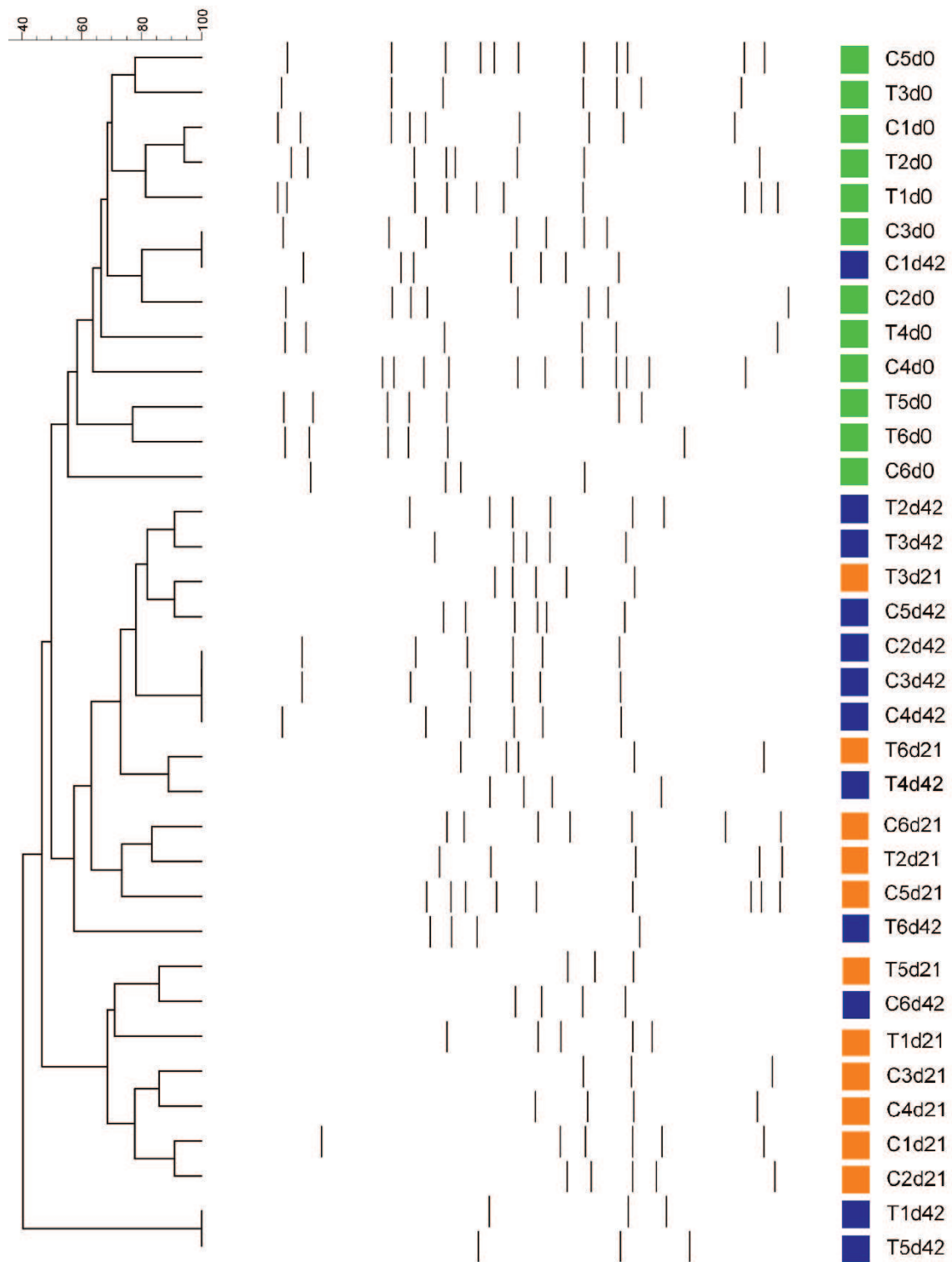


Verde T: lechones grupo probiótico, T1 a T6 día 0 (d0). Naranja T: lechones grupo probiótico, T1 a T6 día 21 (d21). Lila T: lechones grupo probiótico, T1 a T6 día 42 (d42).

En la figura 24 se presenta el dendrograma con los perfiles de GC y GP de los d 0, 21 y 42. Hay una similitud de perfiles de 40% entre todas las muestras. Se observa la separación de 2 perfiles del grupo probiótico (T1 y T5) del d42, mientras que todas las demás muestras pertenecen a un mismo cluster principal. Dentro de éste, se puede observar la formación de 3 clusters, uno que incluye todos los perfiles del d0 y 1 perfil del d 42 correspondiente a GC (similitud de 55%). Los dos clusters restantes presentan un 60% de similitud y 70%, ambos incluyen perfiles de los d 21 y 42 de ambos grupos.



**Figura 24.** Dendrograma de los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana de la materia fecal de los lechones del grupo probiótico y grupo control, días 0, 21 y 42 del ensayo.



Verde: lechones d 0 (d0), C1 a C6: grupo control; T1 a T6: grupo probiótico. Naranja: lechones d 21 (d21), C1 a C6: grupo control; T1 a T6: grupo probiótico. Azul: lechones d 42 (d42), C1 a C6: grupo control; T1 a T6: grupo probiótico.

En la tabla 16 se presentan los resultados del análisis de los índices de diversidad, riqueza y homogeneidad. No se presentaron diferencias en ninguno de los índices entre los GC y GP. El índice de diversidad del GP, fue mayor el d 0 en comparación al d 21 y 42 ( $P=0,010$ ). De la misma manera, el GP también presentó el valor mas alto el d 0 ( $P=0,029$ ) en el índice de riqueza. En cambio en el GC no hubo variaciones en el tiempo en los índices de diversidad, ni en el índice de riqueza. El índice de homogeneidad no presentó variaciones en el tiempo para ninguno de los grupos.

**Tabla 16.** Índices de diversidad, riqueza y homogeneidad del ecosistema microbiano de la materia fecal de los lechones.

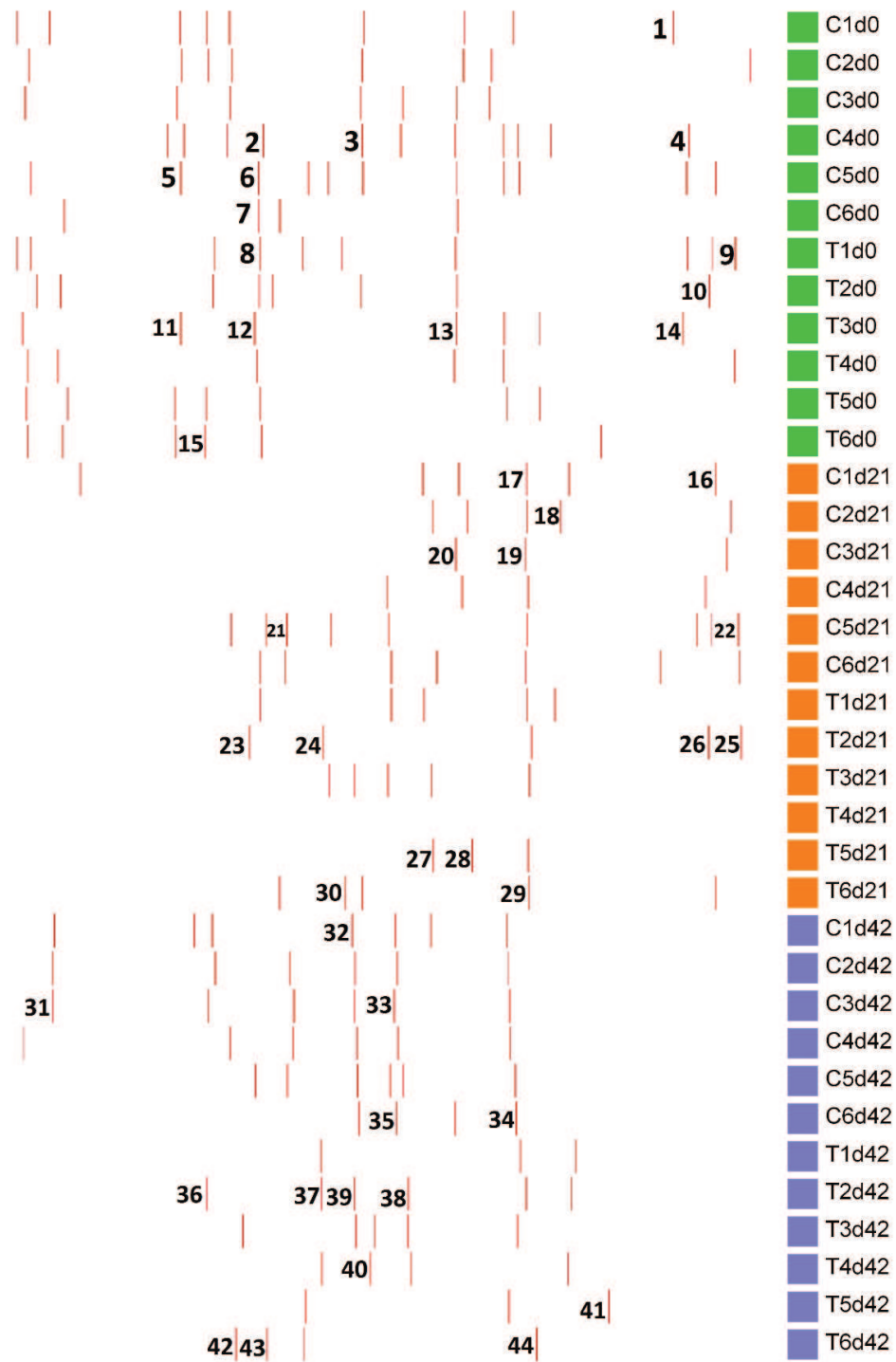
Índices	Grupo	Tiempo (d)			P
		0	21	42	
Diversidad de Shannon	GC	1,88±0,38 <sup>a</sup>	1,60±0,37 <sup>a</sup>	1,65±0,15 <sup>a</sup>	0,247
	GP	1,89±0,20 <sup>a</sup>	1,44±0,23 <sup>b</sup>	1,36±0,31 <sup>b</sup>	
Homogeneidad de Pielou	GC	0,906±0,02 <sup>a</sup>	0,961±0,05 <sup>a</sup>	0,943±0,04 <sup>a</sup>	0,162
	GP	0,941±0,03 <sup>a</sup>	0,954±0,02 <sup>a</sup>	0,972±0,03 <sup>a</sup>	
Riqueza de Margalef	GC	1,91±0,52 <sup>a</sup>	1,38±0,48 <sup>a</sup>	1,48±0,28 <sup>a</sup>	0,115
	GP	1,64±0,30 <sup>a</sup>	1,13±0,23 <sup>b</sup>	1,27±0,26 <sup>b</sup>	

GC: grupo control, GP: grupo probiótico. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar a los 0, 21 y 42 días (d). Diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas dentro del mismo grupo ( $p<0,05$ ).

#### 4.6.2.2. Secuenciación

En la figura 25 se presentan los perfiles obtenidos por DGGE, con las bandas seleccionadas para secuenciar.

**Figura 25.** Perfiles de bandas de DGGE obtenidas de muestras de materia fecal de lechones a los 0, 21 y 42 d del ensayo con bandas seleccionadas para secuenciar.



Verde: lechones d 0 (d0), C1 a C6: grupo control; T1 a T6: grupo probiótico. Naranja: lechones d 21 (d21), C1 a C6: grupo control; T1 a T6: grupo probiótico Lila: lechones d 42 (d42), C1 a C6:

grupo control; T1 a T6: grupo probiótico. Bandas seleccionadas para secuenciar: 1 a 44, los números se ubican a la izquierda de la banda escindida.

En el día 0, el porcentaje de similitud de las secuencias con las secuencias de la base de datos fue entre el 97,14% y el 82,86%. El *phylum Firmicutes* fue el de mayor aparición con 8 bandas, seguido por *Synergistetes* con 3, *Bacteroidetes* con 2 bandas y 1 representante de Proteobacterias. Dos bandas del GC (2 y 7) y dos bandas del GP (8 y 12) encontradas a la misma altura del gel de DGGE, pertenecieron al *phylum Firmicutes* y podrían ser del orden *Clostridiales*. Las bandas 5 y 8 fueron compatibles con microorganismos de la familia *Ruminococcaceae*. Dos bandas del GC (bandas 1 y 4) se asociaron al *phylum Synergistetes* (una de éstas al género *Cloacibacillus*, la otra podría ser del género *Aminivibrio*) mientras que una banda (14) del GP podría ser del mismo *phylum* pero perteneciente a otro género. Además, las bandas 4 y 14 se encontraron a la misma altura, pudiendo ser el mismo microorganismo (Tabla 17).

**Tabla 17.** Porcentaje de identidad de secuencias parciales de 16S ARNr de lechones del d 0 del ensayo, comparadas secuencias presentes en la base de datos del NCBI.

Banda	Grupo	Phylum	Especie relacionada	Identidad (%)	Número NCBI
1	GC	<i>Synergistetes</i>	<i>Cloacibacillus porcorum</i>	94,96%	MN537495.1
	GC		Uncultured <i>bacterium</i> clone 434	94,96%	KY285724.1
	GC	<i>Synergistetes</i>	<i>Synergistes sp. CNM 1720-08</i>	94,96%	KU159767.1
2	GC		Uncultured <i>bacterium</i>	95,65%	KP107970.1
	GC	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Garciella sp. clone 6924</i>	95,65%	KP107893.1
3	GC		Uncultured <i>bacterium</i>	92,96%	JX486684.1
	GC	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Clostridium sp.</i>	91,78%	EU809916.1
4	GC		Uncultured <i>bacterium</i>	91,92%	JQ117874.1
	GC	<i>Synergistetes</i>	<i>Aminivibrio pyruvatiphilus strain</i>	91,84%	MG519324.1
5	GC		Uncultured <i>bacterium</i>	91,18%	JQ130399.1
	GC	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Ruminococcaceae bacterium</i>	87,80%	KP101892.1
6	GC		Uncultured <i>bacterium</i>	82,86%	JQ185232.1
7	GC	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Clostridiales bacterium</i>	91,49%	KX672592.1
8	GP	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Firmicutes bacterium</i>	93,67%	KM650279.1
	GP	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Ruminococcaceae bacterium</i>	92,41%	LT841849.1
9	GP	<i>Bacteroidetes</i>	Uncultured <i>Bacteroidetes bacterium</i>	97,14%	KP716742.1
	GP		Uncultured <i>bacterium</i>	96,61%	KP108813.1
	GP	<i>Bacteroidetes</i>	Uncultured <i>Sphingobacteriaceae bacterium</i>	96,57%	KP104582.1
10	GP	<i>Bacteroidetes</i>	Uncultured <i>Barnesiella sp.</i>	97,11%	KP104979.1
11	GP	<i>Firmicutes</i>	<i>Blautia sp.</i>	96,69%	MG729425.1
	GP	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Lachnospiraceae</i>	96,08%	KP101979.1
12	GP		Uncultured <i>bacterium</i>	85,91%	MF293272.1
	GP	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Clostridiaceae</i>	85,71%	AB089028.1
13	GP		Uncultured <i>bacterium</i>	89,47%	GU601886.1
	GP	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Clostridium sp</i>	85,71%	MG803277.1
14	GP		Uncultured <i>bacterium</i>	91,84%	JF546900.1
	GP	<i>Synergistetes</i>	Uncultured <i>Pyramidobacter sp.</i>	90,82%	LT625531.1
	GP	<i>Synergistetes</i>	Uncultured <i>Synergistaceae</i>	90,82%	LT545834.1
15	GP		Uncultured <i>bacterium</i>	90,36%	LN519016.1
	GP	<i>Proteobacteria</i>	Uncultured <i>Thiobacillus sp.</i>	89,16%	MF042831.1

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

Para las bandas del d 21, los porcentajes de similitud de las secuencias encontradas fueron entre 97,50% y 83,77%. Los *phylum* de mayor aparición en las bandas fueron *Actinobacteria* y *Firmicutes* con 7 representantes cada uno. Solamente una banda perteneció a *Bacteroidetes*. Dos perfiles del GC presentaron una banda (bandas 16 y 22) compatible con el género *Olsenella*. Una banda del GC (banda 18) fue compatible con el género *Bifidobacterium*. Dos bandas a la

misma altura pertenecientes al GC, fueron compatibles con los géneros *Microbacterium* y *Leucobacter*. Las bandas 27 y 29 del GP, fueron compatibles con el género *Clostridium*. En el GP se encontró una banda relacionada al orden *Lactobacillales* (banda 24), pudiendo ser del género *Enterococcus* o *Lactobacillus*. En comparación al d 0, en el d 21 se recuperaron bandas pertenecientes al *phylum Actinobacteria* tanto en el GC como en el GP, estando este *phylum* ausente en el d 0. Además, no hubo ningún representante del *phylum Synergistetes* (Tabla 18).

**Tabla 18.** Porcentaje de identidad de secuencias parciales de 16S ARNr de lechones del d 21 del ensayo, comparadas secuencias presentes en la base de datos del NCBI.

Banda	Grupo	Phylum	Especie relacionada	Identidad (%)	Número NCBI
16	GC		Uncultured <i>bacterium</i>	97.50%	KY285679.1
	GC	<i>Actinobacteria</i>	Uncultured <i>Olsenella sp.</i>	97.50%	KY668857.1
17	GC		Uncultured <i>bacterium</i>	93.55%	GU638298.1
	GC	<i>Actinobacteria</i>	<i>Leucobacter sp.</i>	91.84%	KT223115.1
18	GC	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacterium sp</i>	93.71%	MN049601.1
19	GC		Uncultured <i>bacterium</i>	90.00%	EU492876.1
	GC	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium sp</i>	87.50%	KT630604.1
20	GC	<i>Bacteroidetes</i>	Uncultured <i>Barnesiella sp.</i>	89.14%	KP106386.1
	GC	<i>Bacteroidetes</i>	Uncultured <i>Porphyromonadaceae</i>	89.14%	KP104927.1
21	GC		Uncultured <i>bacterium</i>	86.62%	EF097756.1
	GC	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Lachnospiraceae</i>	86.16%	KP109441.1
22	GC		Uncultured <i>bacterium</i>	97.42%	JQ184111.1
	GC	<i>Actinobacteria</i>	<i>Olsenella umbonata</i>	96.88%	MN537488.1
23	GP		Uncultured <i>bacterium</i>	91.47%	KC337790.1
	GP	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Pseudoramibacter sp.</i>	88.67%	KP107389.1
24	GP	<i>Firmicutes</i>	<i>Lactobacillus parafarraginis</i>	84.93%	KP775924.1
	GP	<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcus hirae</i>	83.77%	MK346852.1
	GP	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Lactobacillus sp</i>	83.77%	LT006873.1
25	GP		Uncultured <i>bacterium</i>	97.42%	JQ184111.1
	GP	<i>Actinobacteria</i>	<i>Olsenella umbonata strain</i>	96.34%	MN537488.1
26	GP		Uncultured <i>bacterium</i>	96.93%	KY285679.1
	GP	<i>Actinobacteria</i>	Uncultured <i>Olsenella sp.</i>	96.93%	KY668857.1
27	GP		Uncultured <i>bacterium</i>	92.59%	JX224470.1
	GP	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Clostridium sp.</i>	91.36%	LC001061.1
28	GP		Uncultured <i>bacterium</i>	92.93%	JF561217.1
	GP	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium paraputrificum</i>	92.86%	MN081661.1
29	GP	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Clostridium sp</i>	91.34%	KF507046.1
30	GC	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Ruminococcaceae</i>	91.14%	KY663398.1
	GC	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Anaerotruncus sp</i>	91.14%	LT625255.1

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

El d 42 del ensayo, se encontró un porcentaje de similitud de las bandas entre 86,73% y 100%. Se encontraron 5 bandas compatibles con el *phylum Firmicutes*, 2 bandas con Proteobacteria, 2 bandas con Synergistetes, 1 con Bacteroidetes y 1 banda con Actinobacteria. Las bandas 34 y 35 perteneciente a *Firmicutes* del GC fueron compatibles con el orden Clostridiales. La banda 34 coincidió con *Clostridium sp.* y la banda 35 era perteneciente a la familia *Lachnospiraceae*. Del *phylum Proteobacteria*, la banda 36 del GP fue compatible con *Nitrosospira sp.* El único representante del *phylum Actinobacteria* (banda 44) fue compatible con *Arthrobacter sp.* La banda 38 del GP también del *phylum Firmicutes* fue compatible con *Anaerotruncus sp.*, también presente en el GP del d 21 (banda 30). Se encontraron 4 bandas no compatibles con ningún *phylum* (bandas 31, 33, 39 y 43). El d 42 presentó mayor diversidad de *phylum* que los d 0 y 21, al igual que el d 21 presentó el *phylum Actinobacteria* pero con 1 solo representante, siendo Firmicutes el de mayor cantidad de bandas al igual que el d 0 (Tabla 19).

**Tabla 19.** Porcentaje de identidad de secuencias parciales de 16S ARNr de lechones del d 42 del ensayo, comparadas secuencias presentes en la base de datos del NCBI.

Banda	Grupo	Phylum	Especie relacionada	Identidad (%)	Número NCBI
31	GC		Uncultured <i>prokaryote</i>	94.03%	KT979631.1
32	GC	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>bacterium</i>	92.65%	HQ492901.1
	GC		Uncultured <i>Firmicutes</i>	90.79%	KJ730135.1
33	GC		Uncultured <i>bacterium</i>	100.00%	AY990827.1
34	GC	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Clostridium sp.</i>	91.84%	DQ168164.1
	GC		Uncultured <i>prokaryote</i>	91.84%	LC241325.1
35	GC	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>bacterium</i>	94.29%	MK647737.1
	GC		Uncultured <i>Lachnospiraceae bacterium</i>	90.53%	EF700560.1
36	GP	<i>Proteobacteria</i>	Uncultured <i>bacterium</i>	96.92%	JQ161420.1
	GP		Uncultured <i>Nitrosospira sp</i>	96.88%	JQ904482.1
	GP		Uncultured <i>ammonia-oxidizing beta proteobacterium</i>	96.88%	JQ725952.1
37	GP	<i>Synergistetes</i>	Uncultured <i>Aminanaerobia bacterium</i>	91.30%	CU925912.1
38	GP	<i>Synergistetes</i>	Uncultured <i>bacterium</i>	91.46%	MF272964.1
	GP		Uncultured <i>Aminanaerobia bacterium</i>	88.04%	CU920731.1
	GP		<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Anaerotruncus sp</i>	86.73%
39	GP		Uncultured <i>bacterium</i>	96.77%	JF658104.1
40	GP	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>bacterium</i>	93.75%	JF615813.1
	GP		Uncultured <i>Firmicutes</i>	92.78%	HM105408.1
41	GP	<i>Bacteroidetes</i>	Uncultured <i>bacterium</i>	97.73%	KP109301.1
	GP		Uncultured <i>Porphyromonadaceae</i>	97.16%	KP105248.1
	GP		<i>Bacteroidetes</i>	Uncultured <i>Bacteroidales</i>	97.16%
42	GP	<i>Proteobacteria</i>	Uncultured <i>bacterium</i>	93.85%	FN567106.1
	GP		Uncultured <i>delta proteobacterium</i>	92.98%	KC009888.1
43	GP		Uncultured <i>bacterium</i>	94.34%	MF315152.1
44	GP	<i>Actinobacteria</i>	Uncultured <i>organism</i>	90.91%	GQ391923.1
	GP		<i>Arthrobacter sp.</i>	90.67%	FN397645.1

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

#### 4.6.3. Hemograma

##### 4.6.3.1 Eritrograma

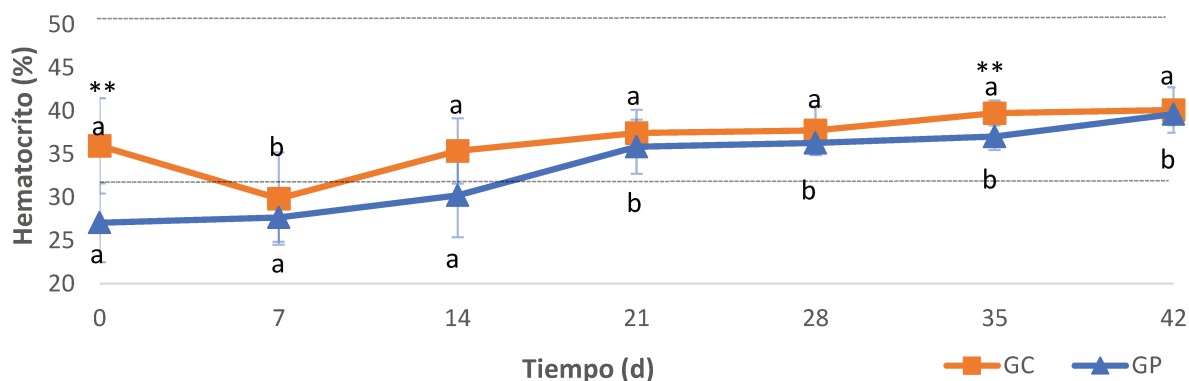
Las variables hematológicas correspondientes a la serie eritrocitaria: Hematocrito (Hto), Hemoglobina (Hb), Volumen corpuscular medio (VCM), Hemoglobina corpuscular media (HCM) y Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) no mostraron diferencias ( $p > 0,05$ ) entre los grupos a lo largo de todo el ensayo. Sin embargo, se encontraron diferencias entre GC



y GP en algunos días. Además, se encontraron variaciones a lo largo del tiempo en algunas variables dentro de un mismo grupo.

El hematocrito presentó diferencias entre grupos los d 0 ( $P=0,048$ ) y el d 35 ( $P=0,043$ ) siendo en ambos días, mayor en el GC que en el GP. A su vez, el GC tuvo el valor más bajo de hematocrito el d 7 ( $P=0,016$ ) en un análisis a lo largo del tiempo. El GP tuvo los valores de hematocrito más bajos ( $P>0,001$ ) los d 0, 7 y 14 en comparación al resto de las semanas del grupo (Figura 26).

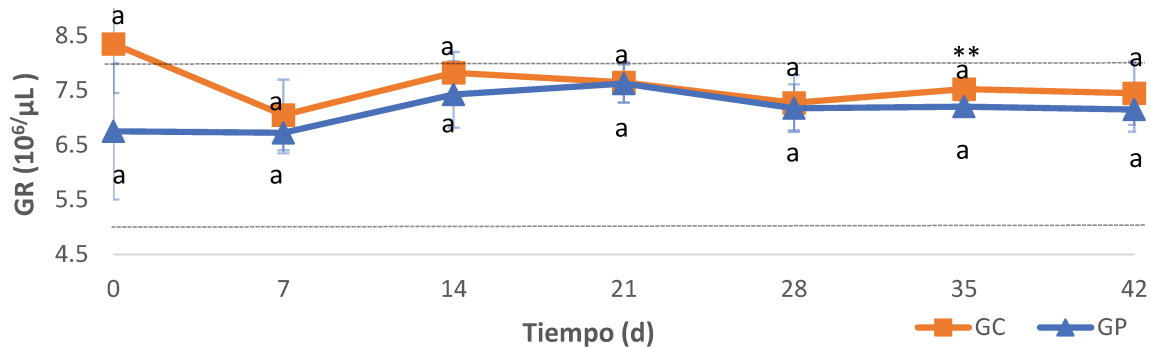
**Figura 26.** Determinación de hematocrito en lechones a lo largo del experimento



GP: grupo probiótico; GC: grupo control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. \*\*Significa que hay diferencias entre GC y GP para el mismo tiempo. Letras distintas significan diferencias en el porcentaje a través del tiempo dentro de cada grupo ( $p<0,05$ ). Las líneas negras de puntos indican el rango de valores normales en porcinos (Schalm's Veterinary Hematology 2010).

Los recuentos de glóbulos rojos fueron mayores en el GC ( $P=0,046$ ) que en el GP (Figura 27). El d 35 el GC tuvo un recuento de GR mayor que el GP ( $P=0,024$ ).

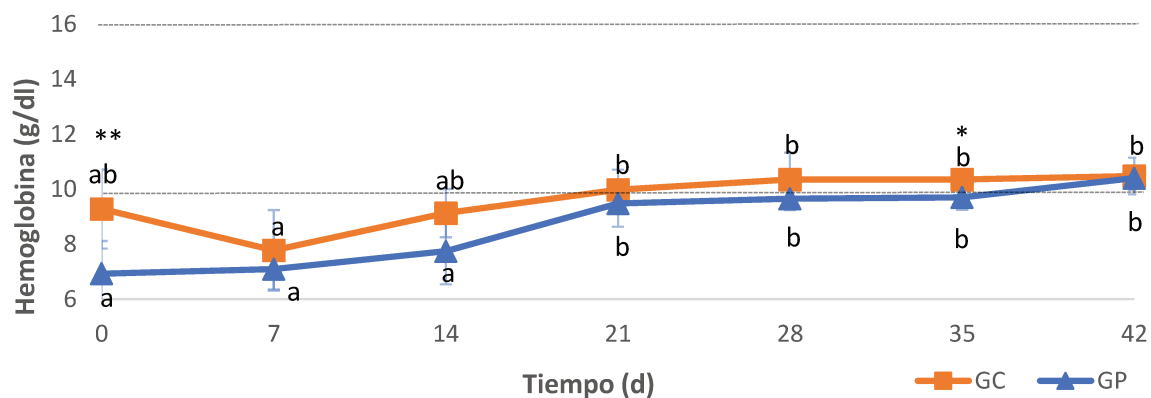
**Figura 27.** Determinación de glóbulos rojos en lechones a lo largo del experimento



GP: grupo probiótico; GC: grupo control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. \*\*Significa que hay diferencias entre GC y GP para el mismo tiempo. Letras distintas significan diferencias en el recuento a través del tiempo dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ). Las líneas negras de puntos indican el rango de valores normales en porcinos (Schalm's Veterinary Hematology 2010).

Para el caso de la hemoglobina, se encontraron diferencias en el d 0 ( $P = 0,045$ ) siendo mayor en el GC. El d 35, hubo una tendencia ( $P = 0,056$ ) a ser mayor en el GC. En el análisis dentro del grupo GC, el d 7 la Hb fue menor que los d 21, 28, 35 y 42 ( $p = 0,013$ ). Para el GP la Hb fue menor los d 0, 7 y 14 en comparación a los d 21, 28, 35 y 42 ( $P > 0,001$ ) (Figura 28).

**Figura 28.** Determinación de hemoglobina en lechones a lo largo del experimento.

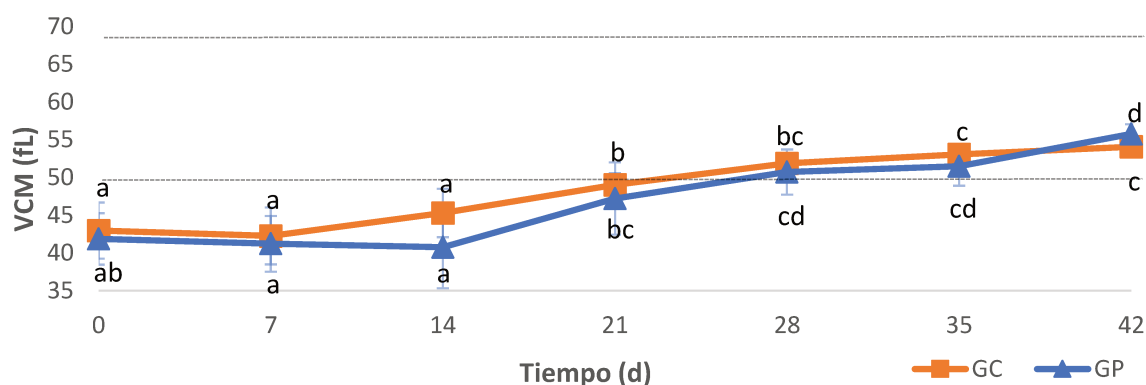


GP: grupo probiótico; GC: grupo control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. \*Significa una tendencia entre GC y GP para el mismo tiempo. \*\*Significa que hay

diferencias entre GC y GP para el mismo tiempo. Letras distintas significan diferencias en el recuento a través del tiempo dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ). Las líneas negras de puntos indican el rango de valores normales en porcinos (Schalm's Veterinary Hematology 2010).

El VCM no presentó diferencias entre los grupos ( $P = 0,438$ ). En el GC, los d 0, 7, y 14, el VCM fue menor que los d 28, 35 y 42. El d 21, el VCM fue menor que los d 35 y 42. Para el GP, en los d 7 y 14, el VCM fue menor que los d 21, 28, 35 y 42 (Figura 29). El d 42 del GP, el VCM fue mayor que los d 0, 7, 14 y 21 del estudio.

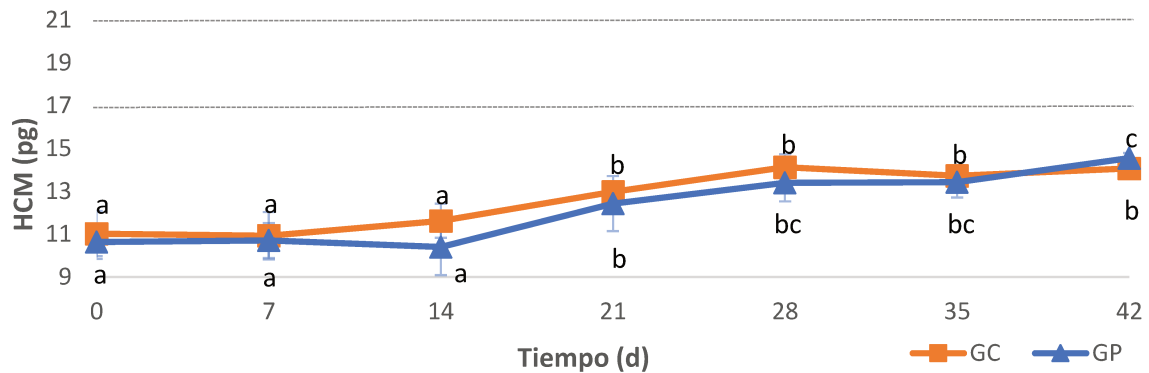
**Figura 29.** Determinación de volumen corpuscular medio en lechones a lo largo del experimento.



GP: grupo probiótico; GC: grupo control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. Letras distintas significan diferencias en el recuento a través del tiempo dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ). Las líneas negras de puntos indican el rango de valores normales en porcinos (Schalm's Veterinary Hematology 2010).

La HCM no mostró diferencias entre GC y GP ( $P = 0,358$ ). Dentro del GC la HCM fue menor los d 0, 7 y 14 ( $P < 0,001$ ) en comparación a los d 21, 28, 35 y 42. Para el GP la HCM fue también menor en los días 0, 7 y 14 ( $P < 0,001$ ) en comparación a los días 21, 28 y 35. Finalmente el d 42 f en el GP, la HCM fue mayor que los d 0, 7, 14 y 21 (Figura 30).

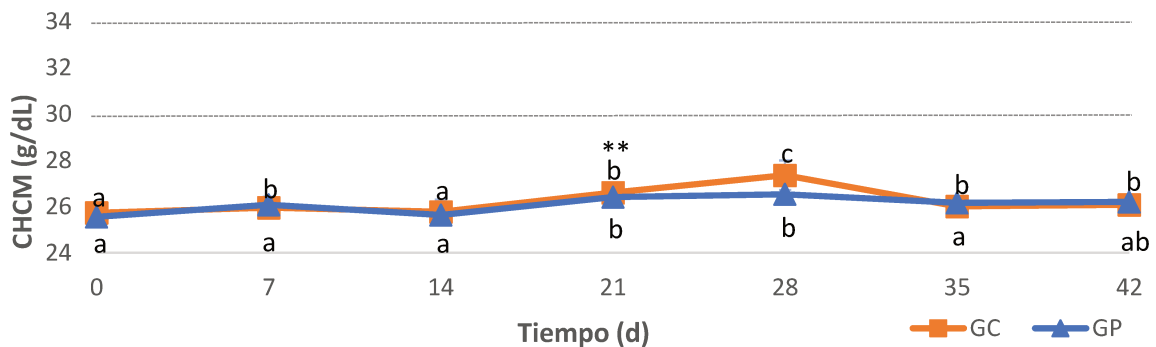
**Figura 30.** Determinación de hemoglobina corpuscular media en lechones a lo largo del experimento



GP: grupo probiótico; GC: grupo control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. Letras distintas significan diferencias en el recuento a través del tiempo dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ). Las líneas negras de puntos indican el rango de valores normales en porcinos (Schalm's Veterinary Hematology 2010).

No hubo diferencias en la CHCM entre los grupos ( $P=0,199$ ). En el análisis semanal, fue mayor en el GC en el d 21 ( $P=0,013$ ). Dentro del GC, los d 0, 7, 14 y 35 tuvieron una CHCM menor que los d 21 y 28. En los d 21 y 42 fue menor que el d 28 (Figura 31).

**Figura 31.** Determinación de la concentración de hemoglobina corpuscular media en lechones a lo largo del experimento.



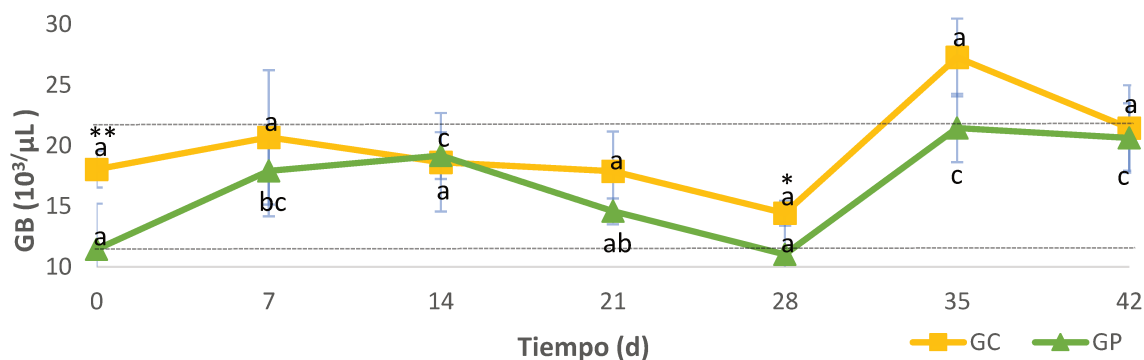
GP: grupo probiótico; GC: grupo control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. \*\*Significa que hay diferencias entre GC y GP para el mismo tiempo. Letras distintas significan diferencias en el recuento a través del tiempo dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ). Las líneas

negras de puntos indican el rango de valores normales en porcinos (Schalm's Veterinary Hematology 2010).

#### 4.6.3.2. Leucograma

La población de GB fue mayor en el GC el d 0 ( $P=0,017$ ). Se encontró una tendencia a mayor recuento el d 28 también para el GC ( $P=0,057$ ). Dentro del GP, los recuentos de GB fueron más bajos los d 0 y 28 ( $P<0,001$ ). Los recuentos más altos del GP se dieron los d 14, 35 y 42 ( $P<0,001$ ) (Figura 32).

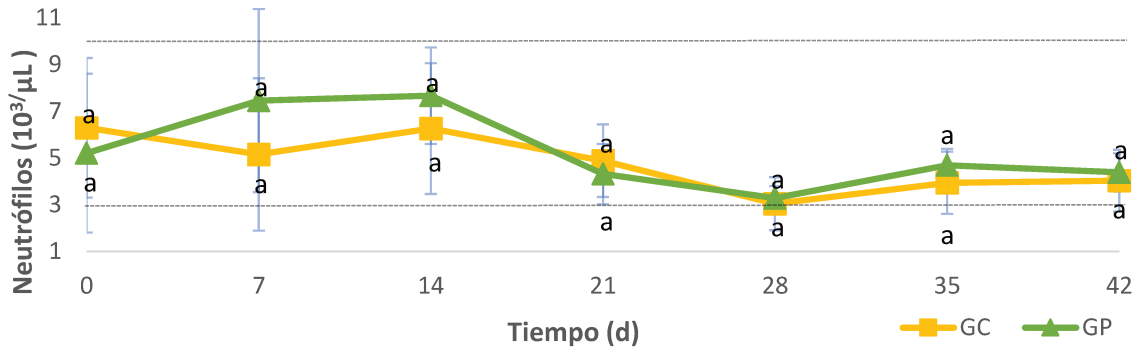
**Figura 32.** Determinación de glóbulos blancos en lechones a lo largo del experimento.



GP: grupo probiótico; GC: grupo control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. \*Significa una tendencia entre GC y GP para el mismo tiempo. \*\*Significa que hay diferencias entre GC y GP para el mismo tiempo. Letras distintas significan diferencias en el recuento a través del tiempo dentro de cada grupo ( $p<0,05$ ). Las líneas negras de puntos indican el rango de valores normales en porcinos (Schalm's Veterinary Hematology 2010).

No se encontraron diferencias entre el GC y el GP para los recuentos de Neutrófilos ( $P=0,648$ ) y Eosinófilos (0,799) (Figuras 33 y 34). La población de Basófilos se encontró solamente en los d 7, 14 y 21 del estudio y no hubo diferencias entre el GC y el GP ( $P=0,780$ ) (Figura 35).

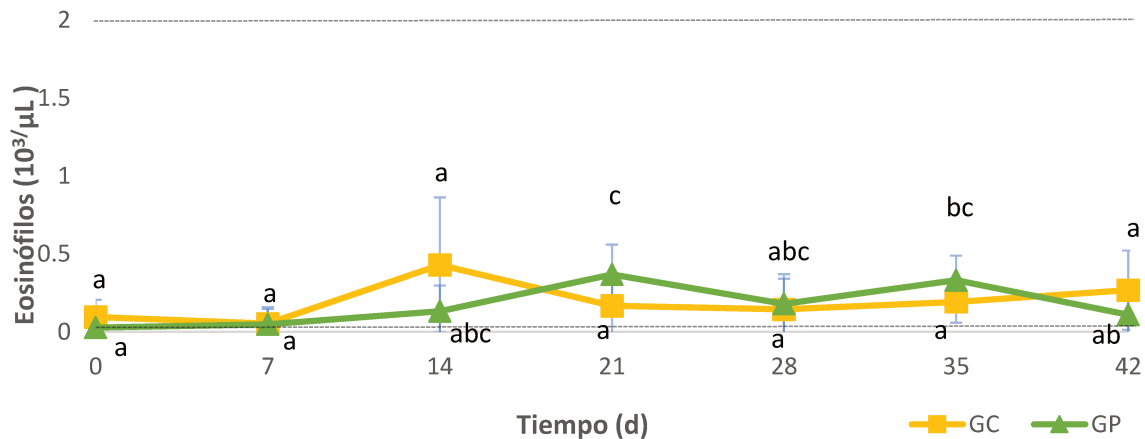
**Figura 33.** Determinación de neutrófilos en lechones a lo largo del experimento



GP: grupo probiótico; GC: grupo control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. Letras distintas significan diferencias en el recuento a través del tiempo dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ). Las líneas negras de puntos indican el rango de valores normales en porcinos (Schalm's Veterinary Hematology 2010).

En el GP, los recuentos de eosinófilos fueron menores en los d 0 y 7 en comparación a los demás días ( $P=0,022$ ). El d 21 tuvo los recuentos más altos de todos los d del ensayo ( $P=0,022$ ) (Figura 34). Dentro del GC, no se encontraron diferencias entre las semanas.

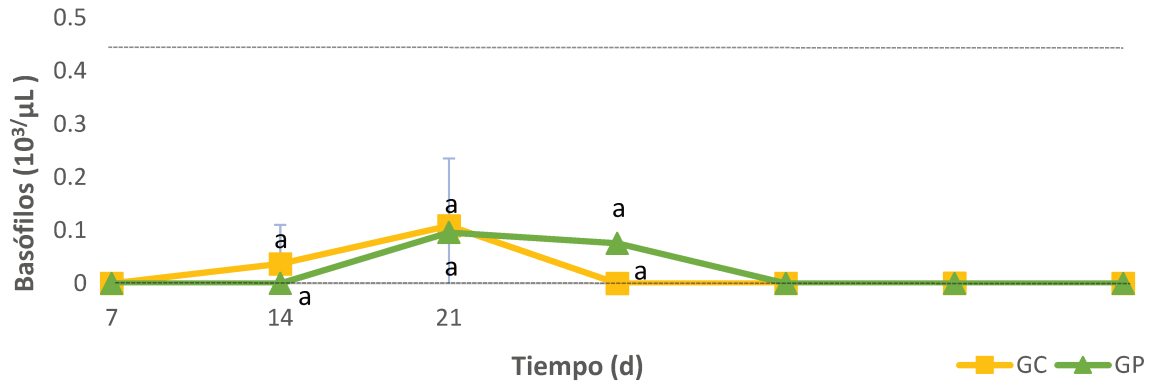
**Figura 34.** Determinación de eosinófilos en lechones a lo largo del experimento



GP: grupo probiótico; GC: grupo control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. Letras distintas significan diferencias en el recuento a través del tiempo dentro de cada

grupo ( $p < 0,05$ ). Las líneas negras de puntos indican el rango de valores normales en porcinos (Schalm's Veterinary Hematology 2010).

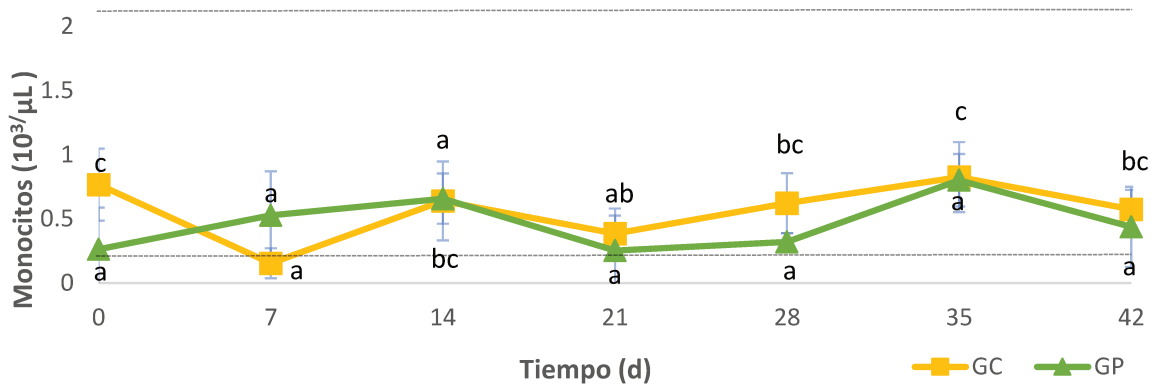
**Figura 35.** Determinación de basófilos en lechones a lo largo del experimento



GP: grupo probiótico; GC: grupo control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. Letras distintas significan diferencias en el recuento a través del tiempo dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ). Las líneas negras de puntos indican el rango de valores normales en porcinos (Schalm's Veterinary Hematology 2010).

No se encontraron diferencias entre los GC y GP para el recuento de monocitos ( $P = 0,150$ ). Dentro del GC, el d 7 fue el recuento más bajo, mientras que los d 0 y 35 fueron los recuentos más altos (Figura 36).

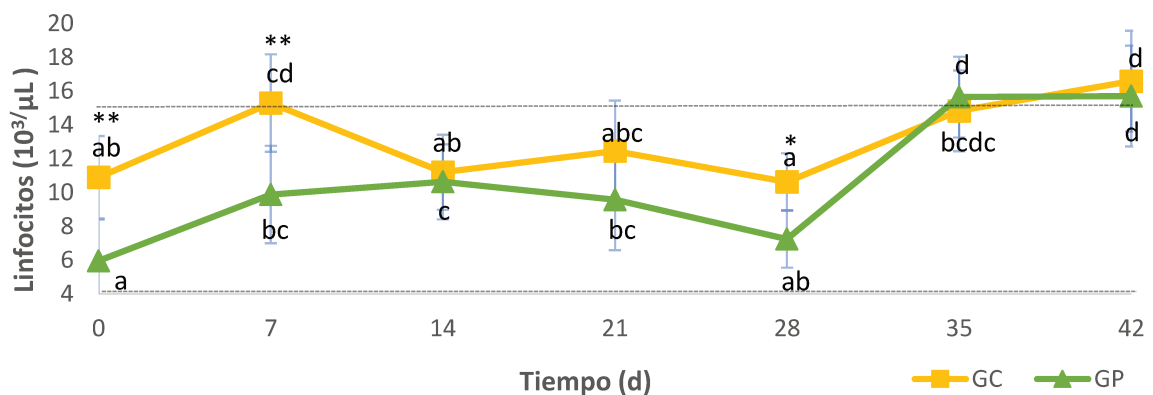
**Figura 36.** Determinación de monocitos en lechones a lo largo del experimento



GP: grupo probiótico; GC: grupo control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. Letras distintas significan diferencias en el recuento a través del tiempo dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ). Las líneas negras de puntos indican el rango de valores normales en porcinos (Schalm's Veterinary Hematology 2010).

En el recuento de linfocitos, se encontraron diferencias entre los grupos, siendo mayores los recuentos en el GC ( $P=0,007$ ). En el análisis semanal, los d 0 y 7 presentaron mayores recuentos el GC ( $P=0,013$  y  $P=0,016$  respectivamente). El d 35 hubo una tendencia a ser mayor el recuento también en el GC ( $P=0,057$ ) (Figura 37).

**Figura 37.** Determinación de linfocitos en lechones a lo largo del experimento



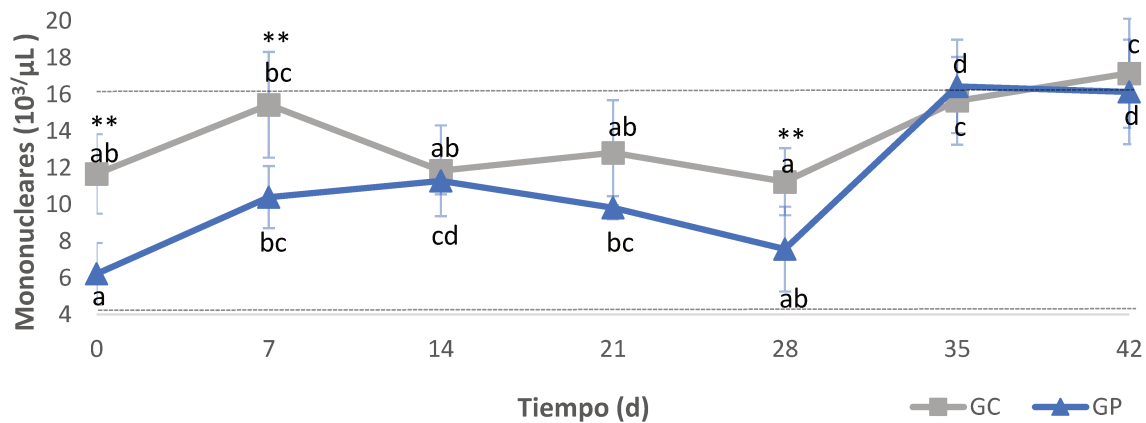
GP: grupo probiótico; GC: grupo control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. \*Significa una tendencia entre GC y GP para el mismo tiempo. \*\*Significa que hay



diferencias entre GC y GP para el mismo tiempo. Letras distintas significan diferencias en el recuento a través del tiempo dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ). Las líneas negras de puntos indican el rango de valores normales en porcinos (Schalm's Veterinary Hematology 2010).

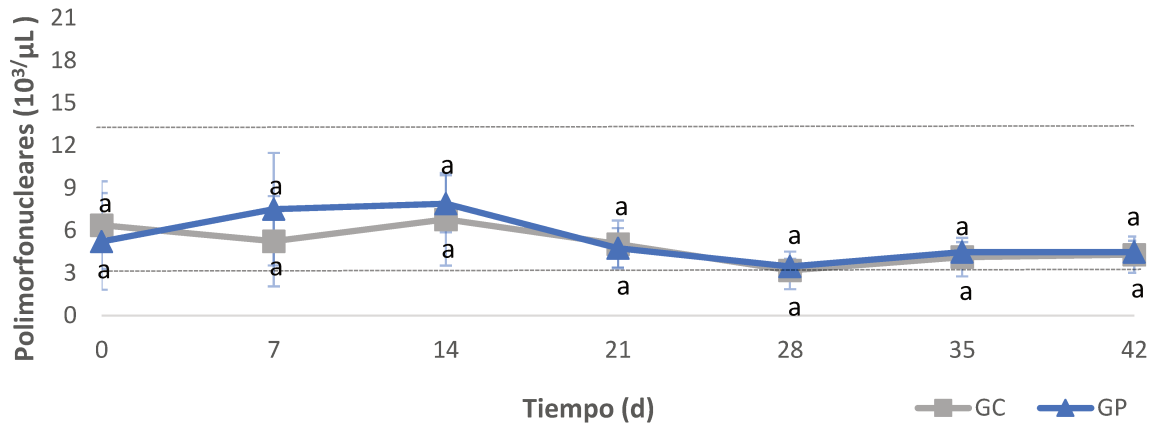
En las Figuras 38 y 39 se muestran los resultados de las células mononucleares y de las polimorfonucleares respectivamente. Se encontraron diferencias en el recuento de células mononucleares entre los GC y GP ( $P = 0,004$ ) siendo mayor el recuento de éstos en el GC (Figura 38). Para el caso de la población de polimorfonucleares, no se encontraron diferencias entre los GC y GP ( $P = 0,679$ ).

**Figura 38.** Determinación de Mononucleares (monocitos y linfocitos) en lechones a lo largo del experimento



GP: grupo probiótico; GC: grupo control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. **\*\***Significa que hay diferencias entre GC y GP para el mismo tiempo. Letras distintas significan diferencias en el recuento a través del tiempo dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ). Las líneas negras de puntos indican el rango de valores normales en porcinos (Schalm's Veterinary Hematology 2010).

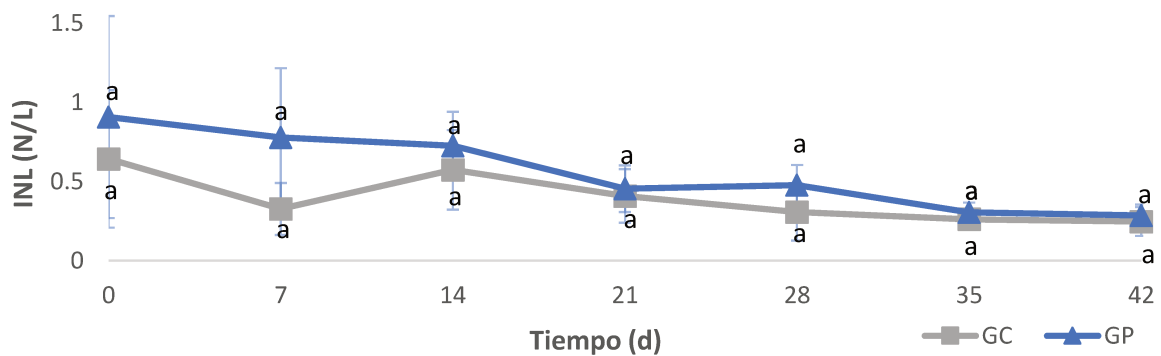
**Figura 39.** Determinación de Polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) en lechones a lo largo del experimento.



GP: grupo probiótico; GC: grupo control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. Letras distintas significan diferencias en el recuento a través del tiempo dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ). Las líneas negras de puntos indican el rango de valores normales en porcinos (Schalm's Veterinary Hematology 2010).

El índice N/L se presenta en la Figura 40. Esta relación no mostró diferencias entre GC y GP ( $P = 0,184$ ). No se encontraron diferencias en el análisis dentro de cada grupo.

**Figura 40.** Relación entre la población de neutrófilos y linfocitos de sangre periférica en cerdos del GC y GP a lo largo del experimento.

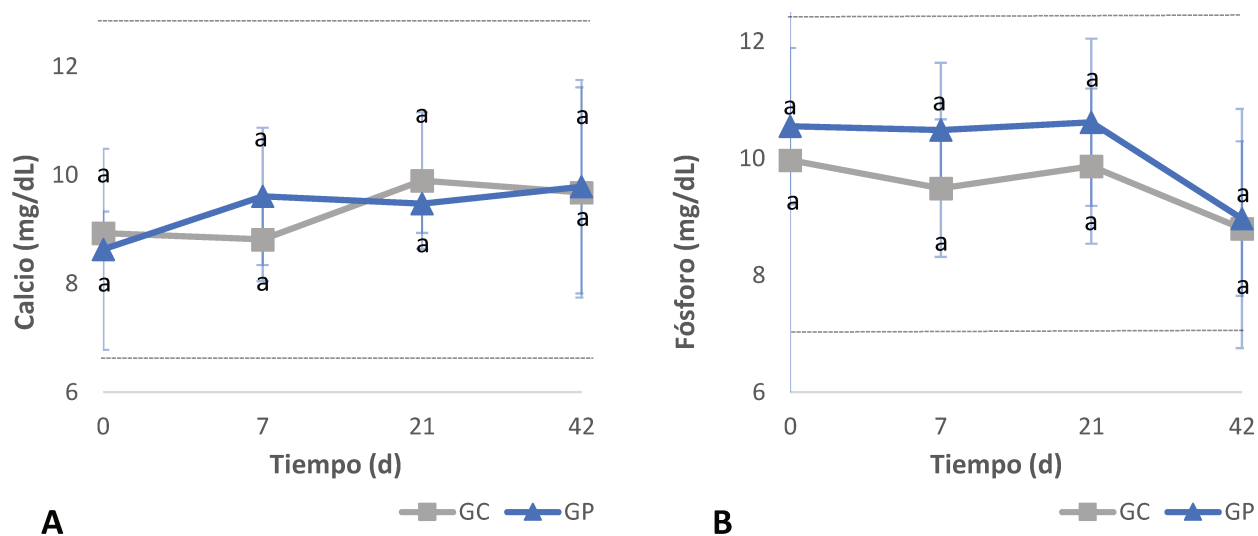


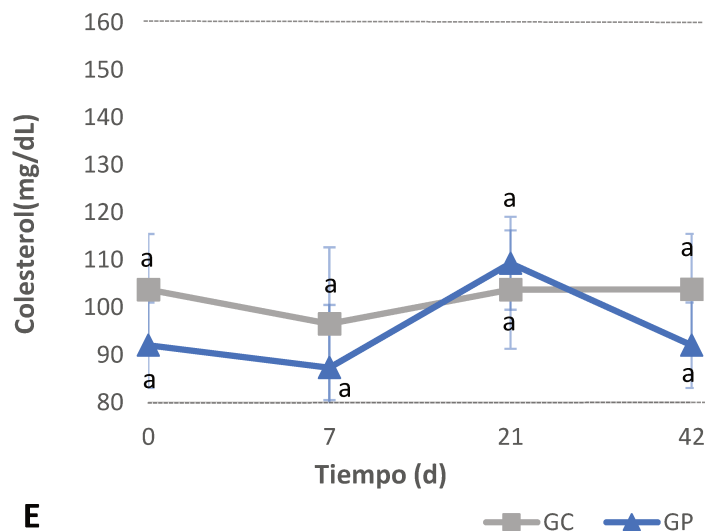
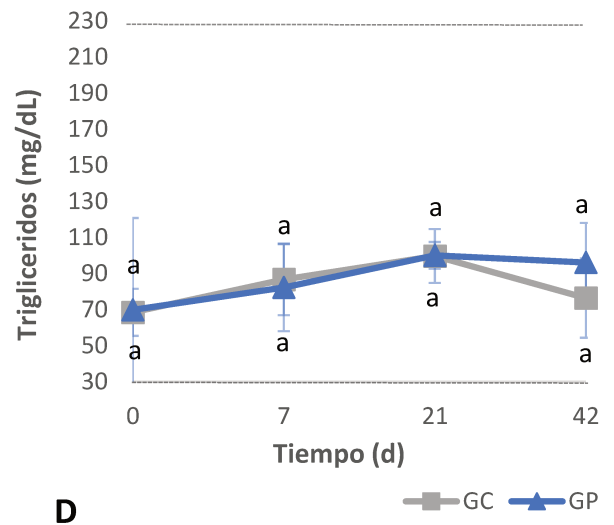
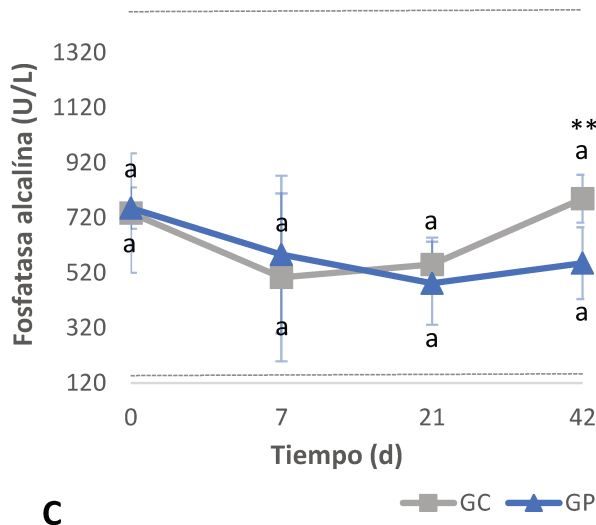
Índice neutrófilos linfocitos (INL). GP: grupo probiótico; GC: grupo control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. Letras distintas significan diferencias en el recuento a través del tiempo dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6.4. Perfil de bioquímica sanguínea en lechones

No se encontraron diferencias entre los GC y GP en los valores de calcio, fósforo, fosfatasa alcalina (FA), triglicéridos y colesterol ( $p > 0,05$ ). En el análisis entre grupos en las diferentes semanas, solamente la FA presentó diferencias ( $p = 0,024$ ), siendo más altos los valores para el GC. No se encontraron diferencias dentro de un mismo grupo en los diferentes tiempos ( $p > 0,05$ ) en ninguna de los metabolitos. En la Figura 41 se presentan los resultados por metabolito.

**Figura 41.** Niveles de calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, triglicéridos y colesterol en lechones del GC y GP a los 0, 7, 21 y 42 d.





A: Calcio en mg/dL; B: Fósforo en mg/dL; C: Fosfatasa alcalina en U/L; D: Triglicéridos en mg/dL; E: Colesterol en mg/dL. Tiempo en días (d). GC: grupo control; GP: grupo probióticos. Letras minúsculas distintas significan diferencias a través del tiempo dentro de cada grupo. \*\*Significa que hay diferencias entre GC y GP para el mismo tiempo. Letras distintas significan diferencias a través del tiempo dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. Las líneas negras de puntos indican el rango de valores normales en porcinos (Perri *et al.*, 2017; Egeli *et al.*, 1998).

#### 4.6.5. Parámetros de crecimiento y medidas corporales

Para evaluar diferencias entre los GC y GP se registraron medidas corporales y parámetros de crecimiento. Los resultados de los parámetros y las medidas corporales se encuentran en la tabla 20.

**Tabla 20.** Parámetros de crecimiento y medidas corporales de lechones a lo largo del ensayo.

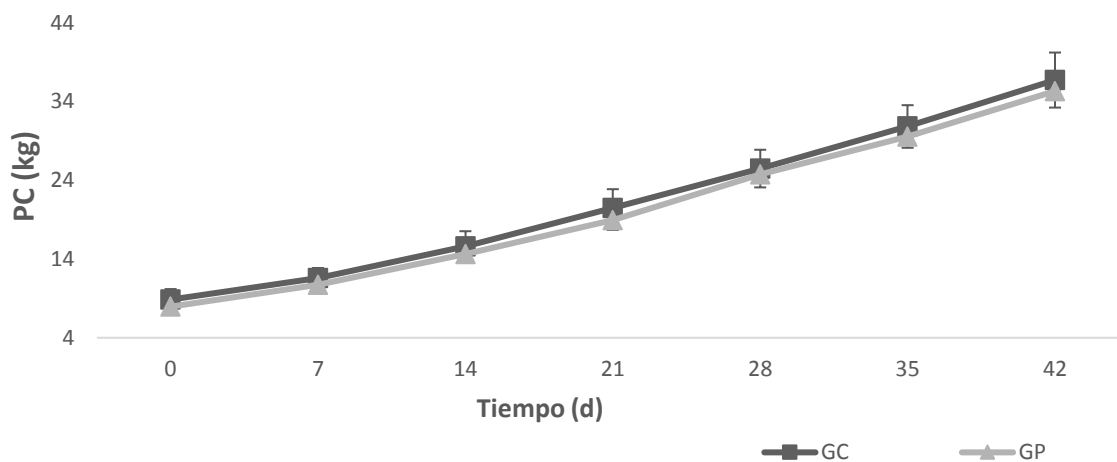
Grupos	Tiempo (d)							<i>p</i>
	0	7	14	21	28	35	42	
<b>Peso (kg)</b>								
GC	8,85±1,33	11,60±1,26	15,60±1,94	20,50±2,38	25,50±2,39	30,85±2,71	36,75±3,50	0,198
GP	7,95±1,09	10,75±1,77	14,65±2,85	18,95±3,16	24,75±3,58	29,55±4,52	35,35±4,92	
<b>Altura a la cruz (cm)</b>								
GC	28,30±0,98	28,35±1,08	31,40±1,78	35,85±2,04	37,65±2,61	40,60±1,94	41,90±1,35	0,543
GP	27,60±2,04	29,00±2,27	31,80±2,49	34,00±2,32	37,15±2,63	40,55±2,72	41,85±2,94	
<b>Ancho de caderas (cm)</b>								
GC	12,65±1,18	13,85±1,73	17,05±1,44	17,60±1,22	18,40±1,81	20,75±1,44	22,1±1,13	0,666
GP	13,00±1,35	14,45±1,36	16,35±1,43	17,35±1,99	18,50±1,73	19,65±1,33	22,1±1,90	
<b>Ancho de hombros (cm)</b>								
GC	13,65±1,08	14,95±0,98	16,20±1,34	18,10±1,20	19,25±0,89	21,60±1,54	22,95±1,21	0,233
GP	13,45±0,86	14,05±1,01	16,00±1,35	17,95±1,07	19,25±1,62	20,80±1,16	22,60±1,51	
<b>Largo dorsal (cm)</b>								
GC	44,95±2,45	50,80±2,20	62,05±2,50	64,90±4,01	69,10±4,04	75,10±2,92	81,00±2,36	0,855
GP	46,80±3,36	50,40±2,80	60,60±5,76	66,00±4,78	71,10±3,90	73,00±5,46	78,80±4,66	
<b>Perímetro torácico</b>								
GC	47,20±2,96	50,30±3,02	54,45±2,92	59,05±2,14	65,65±3,24	69,65±2,93	73,50±2,87	0,073
GP	45,20±3,53	48,95±2,90	53,60±3,27	56,80±3,53	63,55±4,69	67,95±4,41	71,45±4,60	

GC: grupo control; GP: grupo probióticos. Los resultados se expresan como la media ± el desvío estándar.

El análisis estadístico de los parámetros productivos no mostró diferencias entre los grupos ( $P > 0,05$ ).

El peso promedio de los animales al finalizar el ensayo fue de  $36,75 \pm 3,50$  kg para el GC y de  $35,35 \pm 4,92$  kg para el GP, no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0,198$ ) entre los grupos. En el análisis semanal, se encontró una tendencia ( $P = 0,056$ ) en la semana 1 del ensayo (Figura 42).

**Figura 42.** Peso corporal de los lechones durante el ensayo.



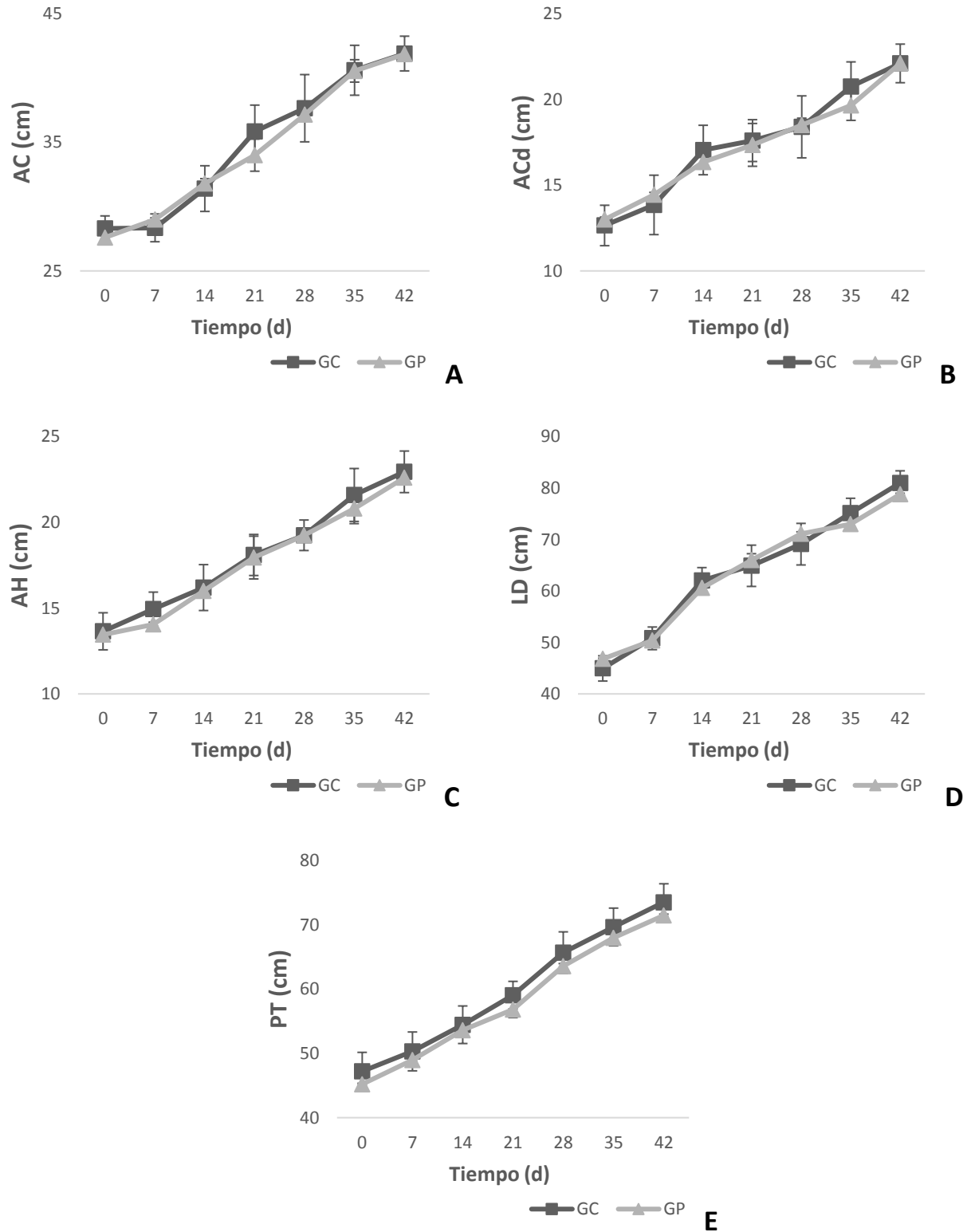
GP: grupo probiótico; GC: grupo control. Peso corporal (PC) expresado en kg. Tiempo: días (d). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar.

La altura a la cruz de los animales tampoco presentó diferencias ( $P=0,543$ ), siendo de  $41,9 \pm 1,35$  cm para el GC y  $41,85 \pm 2,94$  cm para el GP al d 42 del ensayo (Figura 43 A).

El ancho de cadera (Figura 43 B) presentó un promedio de  $22,1 \pm 1,13$  cm para GC y  $22,1 \pm 1,9$  cm para GP al finalizar el ensayo. El ancho de hombros (Figura 43 C) fue de  $22,0 \pm 1,25$  cm para GC y  $22,6 \pm 1,51$  cm para GP, sin diferencia entre los grupos ( $P=0,233$ ).

Los parámetros largo dorsal (Figura 43 D) y perímetro torácico (Figura 43 E) no mostraron diferencias entre los grupos ( $P=0,073$  y  $P=0,885$  respectivamente). El perímetro torácico al finalizar el ensayo fue de  $73,50 \pm 2,87$  cm para el GC y de  $71,45 \pm 4,60$  cm para el GP. El largo dorsal de los lechones al finalizar el ensayo, fue de  $81,00 \pm 2,36$  cm para el GC y de  $78,80 \pm 4,66$  cm para el GP.

**Figura 43.** Parámetros de crecimiento en lechones durante el ensayo.



GP: grupo probiótico; GC: grupo control. **A.** Altura a la cruz (AC) en cm. **B.** Ancho de caderas (ACd) en cm. **C.** Ancho de hombros (AH) en cm. **D.** Largo dorsal (LD) en cm. **F.** Perímetro torácico (PT) en cm. Tiempo: días (d). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar.

#### 4.6.6. Consumo de alimento, eficiencia de conversión y ganancia de peso de los lechones

Los parámetros consumo de alimento, ganancia de peso y eficiencia alimentaria fueron analizados por jaula, estando conformada cada una por 2 animales (tabla 21).

**Tabla 21.** Consumo de alimento, eficiencia de conversión y ganancia semanal de peso en lechones durante el ensayo.

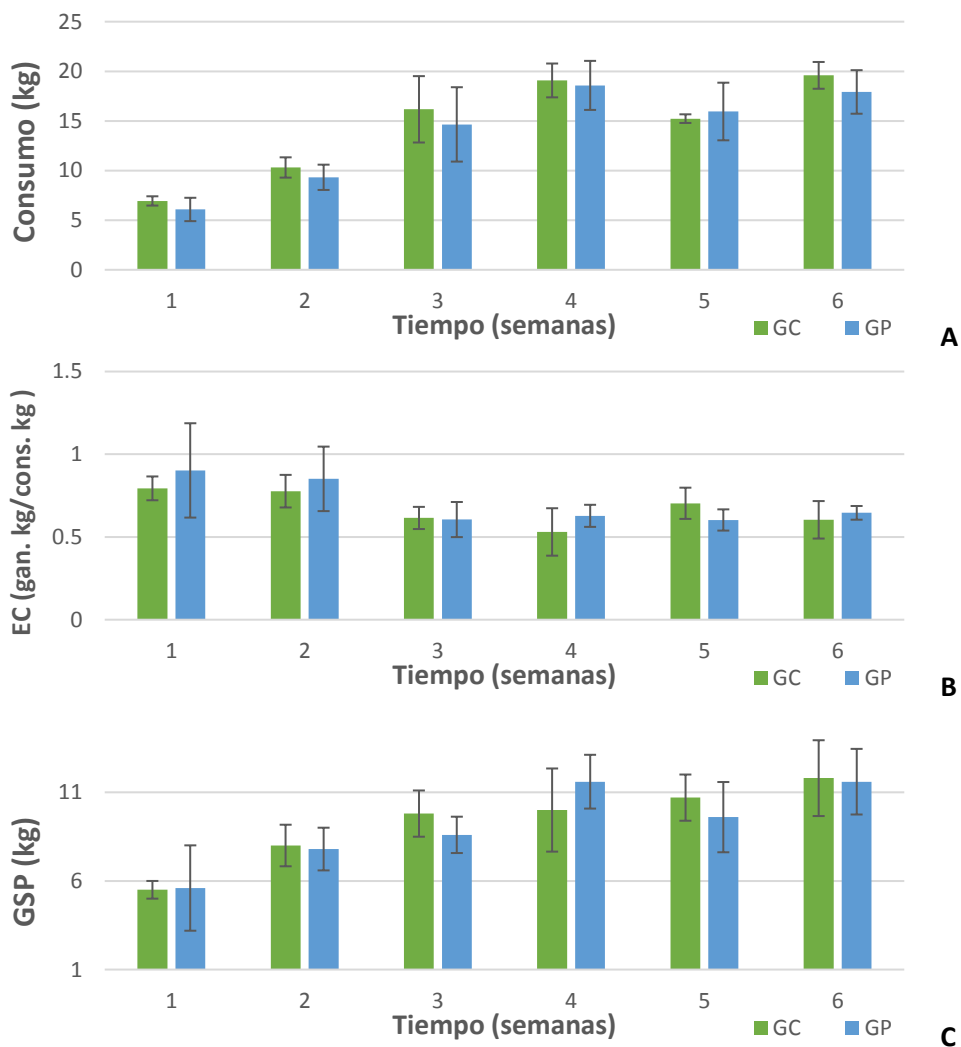
Grupos	Tiempo (semanas)						<i>p</i>
	1	2	3	4	5	6	
<b>Consumo de alimento (kg) x jaula</b>							
GC	6,94 $\pm$ 0,47	10,31 $\pm$ 1,02	16,17 $\pm$ 3,34	19,08 $\pm$ 1,71	15,23 $\pm$ 0,44	19,59 $\pm$ 1,35	0,250
GP	6,08 $\pm$ 1,18	9,32 $\pm$ 1,27	14,65 $\pm$ 3,75	18,58 $\pm$ 2,47	15,95 $\pm$ 2,9	17,92 $\pm$ 2,19	
<b>Eficiencia de conversión (ganancia kg/ consumo kg) x jaula</b>							
GC	0,79 $\pm$ 0,07	0,78 $\pm$ 0,10	0,61 $\pm$ 0,07	0,53 $\pm$ 0,14	0,70 $\pm$ 0,09	0,60 $\pm$ 0,11	0,207
GP	0,90 $\pm$ 0,29	0,85 $\pm$ 0,19	0,61 $\pm$ 0,11	0,63 $\pm$ 0,07	0,60 $\pm$ 0,06	0,65 $\pm$ 0,04	
<b>Ganancia de peso (kg) x jaula</b>							
GC	5,50 $\pm$ 0,50	8,00 $\pm$ 1,17	9,80 $\pm$ 1,30	10,00 $\pm$ 2,35	10,70 $\pm$ 1,30	11,80 $\pm$ 2,14	0,649
GP	5,60 $\pm$ 2,41	7,80 $\pm$ 1,20	8,60 $\pm$ 1,02	11,60 $\pm$ 1,52	9,60 $\pm$ 1,98	11,60 $\pm$ 1,85	

GC: grupo control; GP: grupo probióticos. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar.

No se encontraron diferencias significativas entre grupos para el consumo de alimento ( $P=0,250$ ). La ganancia de peso x jaula, tampoco presentó diferencias entre grupos ( $P=0,649$ ). La eficiencia alimentaria x jaula no presentó diferencias entre GC y GP ( $P=0,207$ ). Los gráficos se presentan en la figura 44.



**Figura 44.** Consumo de alimento, eficiencia de conversión y ganancia semanal de peso de lechones durante el ensayo.



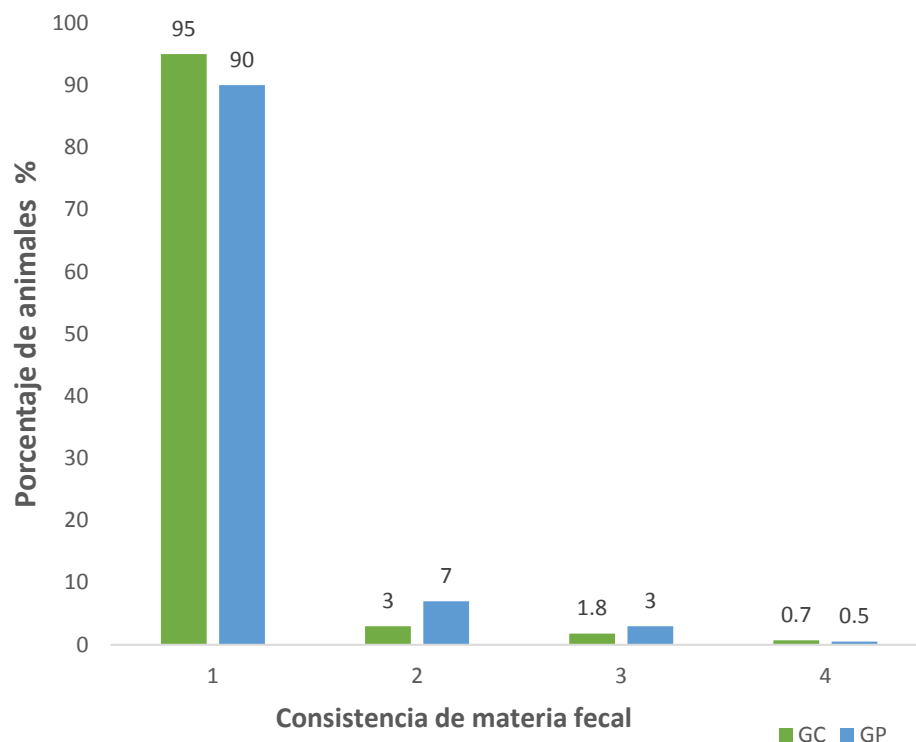
GP: grupo probiótico; GC: grupo control. **A.** Consumo de alimento por jaula (2 animales) expresado en kg. **B.** Eficiencia de conversión alimenticia por jaula (kg de peso ganado/ kg de alimento consumido). **C.** Ganancia semanal de peso (GSP) expresada en kg. Tiempo: semanas (d). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar.

#### 4.6.7. Score fecal y estado de salud de los lechones

Ningún animal presentó signos de enfermedad durante los 42 d del ensayo. Se presentaron en todo el ensayo un total de 11 casos de consistencia fecal  $>2$  para en el GC, 3 casos de consistencia 4 y 8 casos con consistencia 3. En el GP se presentaron 13 casos con consistencia

3 y 2 casos con consistencia 4. No se encontraron diferencias entre los grupos ( $P=0,368$ ). Los resultados del monitoreo de la materia fecal se presentan en la figura 45.

**Figura 45.** Score de materia fecal en lechones durante el ensayo expresados en porcentaje.

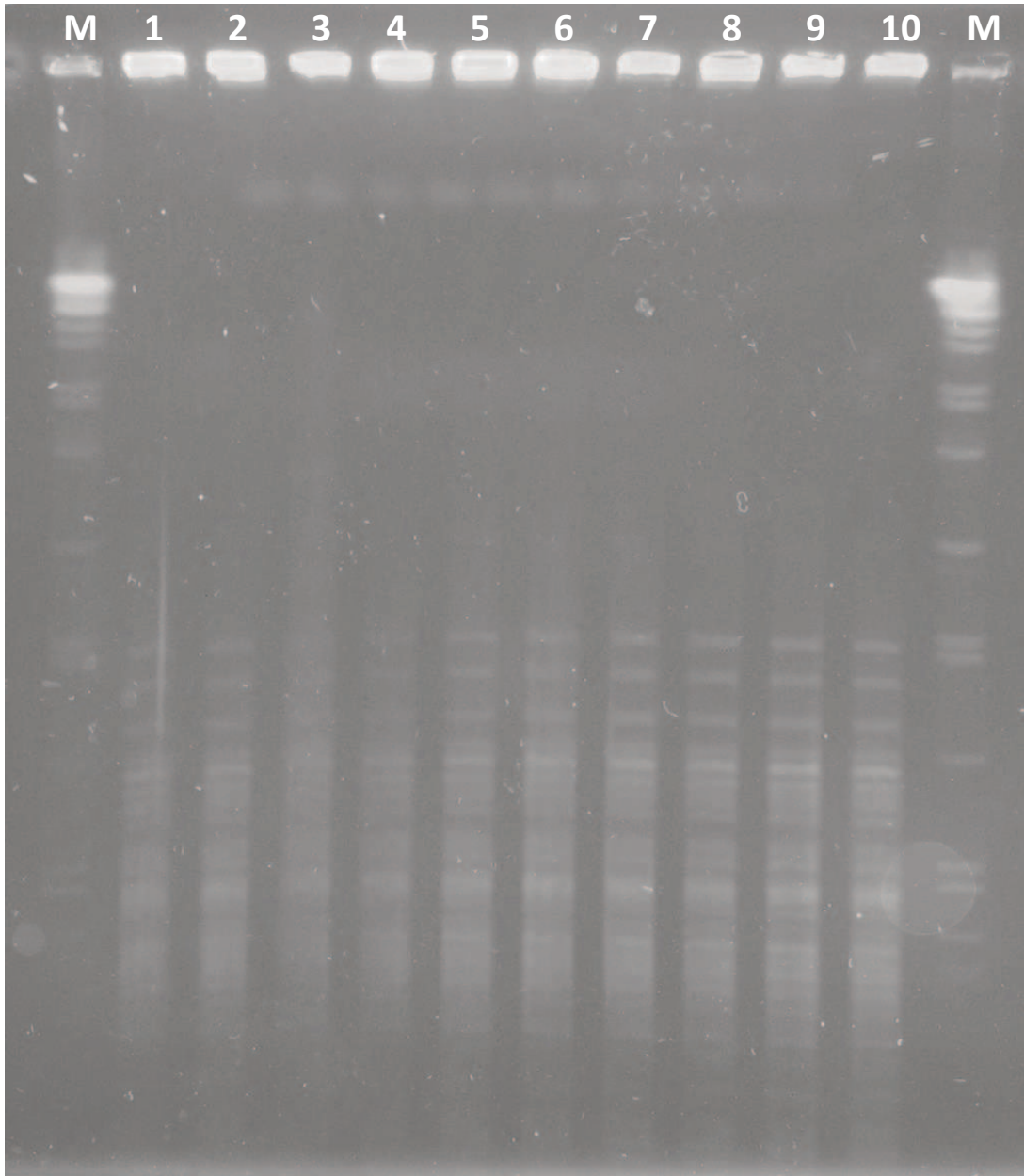


Porcentaje de lechones agrupados por score fecal. GP: grupo probiótico; GC: grupo control. 1: materia fecal formada, 2: materia fecal pastosa, 3: materia fecal cremosa, 4: materia fecal líquida-acuosa.

#### 4.6.8. Monitoreo de la cepa *L. reuteri* DSPV002C mediante electroforesis en gel de campos pulsados

Se observó una similitud del 100 % entre las cepas en estudio. Las mismas presentaron el mismo número de bandas y el mismo tamaño (Figura 46).

**Figura 46.** Perfiles electroforéticos obtenidos mediante PFGE

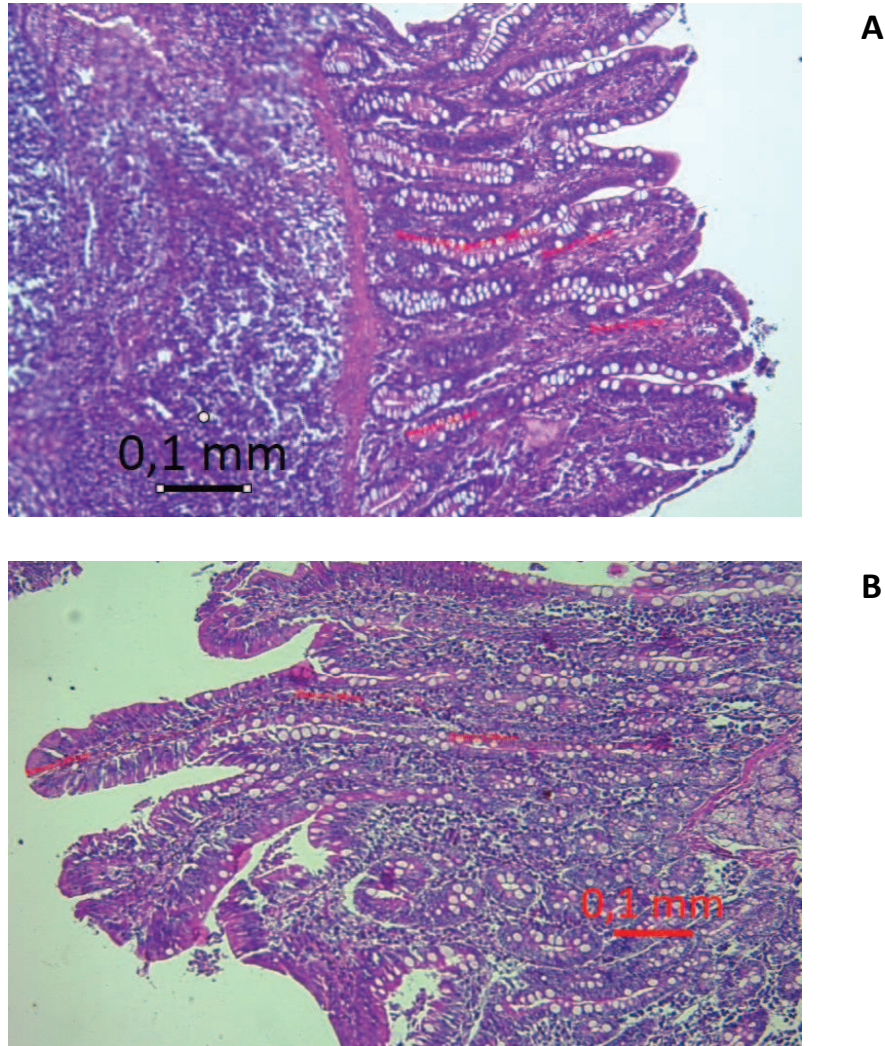


Calles del gel: (M) Patrones moleculares; (1) *L. reuteri* DSPV002C wildtype; (2 y 3) *L. reuteri* resistente a rifampicina; (4) *L. reuteri* recuperada desde macrocápsulas G:A7,5%; (5 a 10) Aislamientos de *L. reuteri* resistente a rifampicina obtenidos desde cerdos los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 del ensayo *in vivo*.

#### 4.6.9 Histomorfometría de intestino delgado

En la Figura 47 se muestran a modo de ejemplo, cortes histológicos de intestino de los cerdos con las mediciones.

**Figura 47.** Cortes histológicos de intestino delgado de cerdos suplementados y no suplementados con la cepa probiótica.



Cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina (H-E) con medición de longitud de vellosidades y profundidad de criptas. **A.** Íleon de un cerdo de grupo control (GC). **B.** duodeno de un cerdo del grupo probiótico (GP).

En el duodeno, no se encontraron diferencias en la longitud de las vellosidades entre los GC y GP ( $P=0,145$ ). La altura promedio de las vellosidades intestinales de duodeno, fue de  $0,3\pm 0,09$  mm para el GP y  $0,2\pm 0,06$  mm para el GC. La profundidad de las criptas, presentó una tendencia a ser mayor en el GC con  $0,3\pm 0,06$  mm frente al GP con  $0,2\pm 0,02$  mm ( $P=0,066$ ). La relación altura de vellosidad/profundidad de cripta (V/C), fue mayor en el GP ( $P=0,029$ ).

La altura de las vellosidades del yeyuno fue de  $0,2\pm 0,03$  mm para el GP y  $0,2\pm 0,01$  mm para el GC. En el íleon, la altura fue de  $0,2\pm 0,02$  mm y  $0,2\pm 0,04$  mm para GC y GP respectivamente. No se encontraron diferencias entre los GC y GP en la altura de las vellosidades en yeyuno ( $P=1,0$ ) e íleon ( $P=1,0$ ). La profundidad de las criptas y la relación V/C en yeyuno e íleon no presentaron diferencias entre los GC y GP (Tabla 22).

**Tabla 22.** Altura de vellosidades intestinales, profundidad de criptas y relación V/C en diferentes porciones del intestino delgado de lechones.

	GC	GP	P
<b>Duodeno</b>			
Altura (mm)	$0,2\pm 0,06$	$0,3\pm 0,09$	0,145
Profundidad (mm)	$0,3\pm 0,06$	$0,2\pm 0,02$	0,066
V/C	$0,7\pm 0,1^A$	$1,6\pm 0,4^B$	0,029
<b>Yeyuno</b>			
Altura (mm)	$0,2\pm 0,03$	$0,2\pm 0,01$	1,000
Profundidad (mm)	$0,2\pm 0,05$	$0,2\pm 0,03$	0,427
V/C	$1,5\pm 0,2$	$1,3\pm 0,1$	0,182
<b>Íleon</b>			
Altura (mm)	$0,2\pm 0,02$	$0,2\pm 0,04$	1,000
Profundidad (mm)	$0,2\pm 0,01$	$0,2\pm 0,04$	0,364
V/C	$1,4\pm 0,2$	$1,4\pm 0,2$	0,932

Altura de vellosidades intestinales (Altura) en mm; Profundidad de criptas (Profundidad) en mm; Relación altura de vellosidades/Profundidad de criptas (V/C).

## **5. Discusión**

### **5.1 Producción de macromacrocápsulas probióticas**

La viabilidad de los microorganismos probióticos es de suma importancia ya que, para ejercer su efecto benéfico sobre la salud del hospedador, deben mantenerse viables hasta llegar a su sitio de acción, además de soportar su procesamiento y almacenamiento hasta el momento de su administración. Diferentes estudios han indicado que la supervivencia de los microorganismos en productos que contienen probióticos libres es bastante baja (De Vos *et al.*, 2010; Champagne y Fustier, 2007; Kailasapathy, 2002, 2009). Las condiciones de almacenamiento son críticas para la supervivencia de los microorganismos, estos deben ser protegidos del calor, la luz, el oxígeno y la humedad (Wang *et al.*, 2004). Por lo tanto, proporcionar a los microorganismos una barrera física para resistir a las condiciones ambientales adversas es un enfoque que actualmente recibe considerable interés (Kailasapathy, 2009).

La encapsulación de los microorganismos probióticos cumple una función protectora de los mismos más que una función de liberación controlada (Champagne and Kailasapathy, 2008; Zuidam y Shimoni, 2009) y la viabilidad de los microorganismos encapsulados va a depender en parte de las características fisicoquímicas de las cápsulas (Burgain *et al.*, 2011).

Este estudio nos permitió seleccionar los materiales con mejores aptitudes para la conformación de la matriz integrante de las macrocápsulas transportadoras de microorganismos probióticos. Los materiales que seleccionamos, fueron los que presentaron una mezcla homogénea y una fácil separación del soporte. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por otros autores (Fakhouri *et al.*, 2015; López de Lacey *et al.*, 2012) que utilizaron estos materiales como películas comestibles de recubrimiento. Al ir aumentando la concentración de los componentes se obtuvieron matrices con mayor consistencia final en las mezclas. Las matrices de gelatina y almidón pregelificado mostraron una mejor integración de los materiales, al no separarse en fases.

La gelatina es un material óptimo para la encapsulación de microorganismos, ya que el mismo es de bajo costo y de primera elección para su utilización a nivel industrial debido a su excelente solubilidad en agua, su capacidad emulsionante y espesante además de una alta actividad de reticulación por la presencia de grupos amino primarios (Shu *et al.*, 2006). El otro material seleccionado para la conformación de la matriz fue el almidón pregelificado. El almidón es un material ampliamente utilizado para la encapsulación de probióticos (Xing *et al.*, 2014; Dafe *et al.* 2017; Ashwar *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2016), sin embargo, la utilización de almidón pregelificado no está muy difundida. Este último, también es un material económico para su utilización a nivel industrial y presenta la ventaja sobre almidones nativos, de tener una mayor capacidad de liberación controlada, debido a la rápida formación de un gel en superficie (Yoon *et al.*, 2007;

Diaz-Gomez *et al.*, 2016). Si bien la utilización de goma arábica en la encapsulación de probióticos es de uso común (Su *et al.*, 2007; Arepally y Goswami, 2019; Eratte *et al.*, 2015; Hsiao *et al.*, 2004), su combinación con gelatina y almidón pregelificado, no mantuvo una homogeneidad en la mezcla, separándose en fases y no contribuyó a la estabilidad de la mezcla para la potencial matriz. Sumado a esto, la goma arábica no es un material económico y el costo de los materiales es un factor competitivo importante para la producción a nivel industrial. Los estudios que consideran sistemas alternativos, como los biopolímeros (gelatina y almidón en este caso) para la protección de alimentos, han aumentado significativamente en los últimos años. Estos materiales son completamente biodegradables, a menudo comestibles y tienen pocos efectos ambientales (Fadini *et al.*, 2013; Martelli y Laurindo, 2012). Debido a estos factores y en comparación a la gelatina y el almidón pregelificado, se desestimó el uso de la goma arábica para la conformación de la matriz.

Para mejorar la estabilidad a largo plazo de los microorganismos, es importante su preservación en forma seca, en la que se reduce el contenido de agua (Vesterlund *et al.*, 2012). Son necesarias entonces, estrategias bien diseñadas para proteger a los microorganismos durante los procesos de fabricación y para mantener su viabilidad durante el proceso de secado (Broeckx *et al.*, 2016). La matriz utilizada para la encapsulación de los microorganismos debe no solo proteger a los microorganismos, sino también mantener su integridad durante el proceso de secado, ya que los principales mecanismos por los cuales se inactivan los microorganismos durante y luego de los procesos de secado, son el estrés osmótico, térmico, oxidativo y de desecación (Santivarangkna *et al.*, 2008; Lian *et al.*, 2003).

Para la evaluación del secado de las matrices, se comparó la liofilización con el secado en estufa y secado a temperatura ambiente. La liofilización es utilizada para la deshidratación de materiales termosensibles y compuestos bioactivos por las bajas temperaturas que utiliza la técnica (Anandharamakrishnan *et al.*, 2010; Ezhilarasi *et al.*, 2013). La liofilización fue el método más eficiente, con mayor pérdida de agua y en menor tiempo en las 3 matrices evaluadas. Este secado no presentó adherencia al soporte, tampoco separación de fases y mantuvo la estructura y el color de las matrices, la cuales son las características deseadas de la matriz que conforme las macrocápsulas transportadoras de microorganismos probióticos. Los métodos de secado mediante estufa y a temperatura ambiente fueron más lentos y alteraron la estructura y el color de las matrices. Además, mediante estos métodos, las matrices presentaron adherencia al soporte y ruptura al separarlas del mismo. Estas son características indeseadas al momento de incorporar los microorganismos a la matriz, ya que esto dificultaría la manipulación y el procesamiento de las macrocápsulas.



La implementación de liofilización como método de conservación de probióticos se fundamenta en que la baja actividad de agua conserva la viabilidad bacteriana, además de mejorar la estabilidad de la formulación en la que están preservadas las bacterias (Kos *et al.*, 2008). Con este trabajo pudimos evaluar la supervivencia de los microorganismos en las dos matrices de gelatina + almidón y en las tres condiciones de secado. La pérdida de viabilidad fue mucho menor con el secado por liofilización, siendo un método mucho más eficiente para la conservación de los microorganismos. Sin embargo, se ha demostrado que la utilización de liofilizado como método de conservación por sí solo, es perjudicial para la supervivencia de las bacterias y, por lo tanto, es necesario implementar alguna medida para proteger a los microorganismos (Zarate y Nader-Macias, 2006).

La incorporación de crioprotectores es una respuesta a este problema, y el tipo de crioprotector utilizado, determina el grado de viabilidad durante el proceso de secado, así como durante su almacenamiento (Govender *et al.*, 2014). Los derivados de productos lácteos (Heidebach *et al.*, 2009; Ming *et al.*, 2009; Vincenzetti *et al.*, 2011) y proteínas del suero de queso (Weinbreck *et al.*, 2010; Ying *et al.*, 2010) están ampliamente difundidos como crioprotectores. La maltodextrina también ha sido utilizada por su efecto crioprotector (Samedi y Charles, 2019; Kahar *et al.*, 2016). Los crioprotectores según Liu *et al.* (2017) pueden ser divididos en dos categorías, los de bajo peso molecular y de alto peso molecular. El PS, está constituido principalmente por lactosa, considerado un crioprotector de bajo peso molecular. Durante el secado por liofilización, el agua es removida, resultando en un incremento de las interacciones de van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas. En este proceso, el aumento del estrés compresivo, causa que los fosfolípidos de las membranas celulares entren en un estado de transición de fase (de líquido a gel) durante la cual se producen rupturas de membrana celular. El reemplazo del agua por azúcar, puede reducir la transición de fase en las membranas celulares durante el secado. Los azúcares crioprotectores, pueden interactuar con los fosfolípidos de membrana a través de enlaces de hidrógeno entre el azúcar y los grupos fosfato en la superficie de la bicapa lipídica (Liu *et al.*, 2017) evitando daños celulares. La maltodextrina, al ser un polímero de glucosa, es considerada un protector de alto peso molecular en la clasificación de Liu *et al.*, (2017). El mecanismo de acción de los protectores de alto peso molecular es mediante adsorción a las membranas celulares con la formación de una capa viscosa, que puede inhibir la velocidad de crecimiento del hielo al aumentar la viscosidad de la solución, evitando así el shock osmótico causado por la concentración de sales (Carvalho *et al.*, 2004).

Por otro lado, los agentes crioprotectores pueden ser agregados durante el crecimiento de los microorganismos o antes de congelarlos o secarlos (Morgan *et al.*, 2006). En nuestro trabajo, el

PS, además de ser adicionado antes del secado, ya era parte del medio de cultivo, en contraposición con la maltodextrina, que fue agregada antes del secado y no formaba parte del medio de cultivo para el desarrollo de la biomasa. Este contacto con el PS durante el crecimiento de la cepa podría tener alguna influencia en el mejor desempeño del PS como crioprotector, frente a la maltodextrina. El PS ejerció una protección mayor que la maltodextrina en la viabilidad de *L. reuteri* DSPV002C a largo plazo, en todas las temperaturas de almacenamiento, permitiendo mantener la DMR por mayor tiempo. Además, la elección de PS o maltodextrina como crioprotectores puede ser de interés, en el caso de la producción industrial de las cápsulas, por su bajo costo. A su vez, la utilización del PS como crioprotector podría ser de interés para la industria láctea, ya que tendría un destino que le aportaría valor agregado a uno de sus subproductos.

Para poder incorporar los microorganismos encapsulados en la dieta de los cerdos junto con el alimento, es necesario que las macrocápsulas tengan un tamaño similar al mismo. La utilización de moldes de 10mm de diámetro permitió generar macrocápsulas de un tamaño similar al alimento peletizado para cerdos. De esta manera se obtuvo un producto apto para ser incorporado y mezclado con la dieta de los animales sin interferir en la alimentación habitual de éstos, siendo una ventaja para su implementación en granjas.

La evaluación de diferentes proporciones de microorganismos y matrices, nos permitió seleccionar una macrocápsula con altas concentraciones de microorganismos. Las macrocápsulas con una proporción 9:1 de inóculo:matriz, mostraron la recuperación más alta de UFC/cáp en comparación a las demás proporciones evaluadas. Es necesario partir de una alta concentración de microorganismos por macrocápsula para poder asegurar una carga bacteriana viable adecuada hasta su administración a los animales, siendo necesaria una DMR de  $10^8$  UFC/d. La macrocápsula con proporción inóculo:matriz de 9:1 nos permitió obtener un producto con una cantidad de microorganismos, superior a la DMR.

Entre los factores más importantes que afectan la viabilidad de los probióticos durante el almacenamiento, se encuentra la presencia de oxígeno y el potencial redox (Lee y Salminen, 2009). El nivel de oxígeno debe ser mínimo para evitar pérdida de viabilidad de los microorganismos durante el almacenamiento. Una de las técnicas disponibles para reducir el contenido de oxígeno es el envasado en vacío, método utilizado por otros autores para la conservación de probióticos (Wang *et al.*, 2016; Rodríguez-Barona *et al.*, 2016; Valerio *et al.*, 2015; Chaikham, 2015). Otro factor importante es la temperatura de almacenamiento de los

microorganismos, siendo la viabilidad de las bacterias probióticas inversamente proporcional a la temperatura de almacenamiento (Gardiner *et al.*, 2000).

En este trabajo se observó una disminución de la viabilidad en todas las macrocápsulas a lo largo de los 210 días de duración del ensayo. No hubo diferencias entre las matrices utilizadas (G:A7,5 9:1 y G:A20 9:1) sobre la viabilidad de los microorganismos, sin embargo, el comportamiento de estas matrices fue diferente en relación a la temperatura de almacenamiento. Con respecto a la temperatura de almacenamiento, se encontró mayor pérdida de viabilidad en las condiciones de refrigeración y temperatura ambiente que en congelación. Pedroso *et al.* (2012) atribuye la pérdida de viabilidad a temperatura ambiente y de refrigeración, a que los microorganismos se encuentran metabólicamente activos, con producción de ácidos metabólicos, bacteriocinas, y ausencia de sustratos. En nuestro estudio, las macrocápsulas en temperatura ambiente, perdieron viabilidad llegando a recuentos inferiores a la DMR entre los 35 y 70 días de almacenamiento, siendo este método el menos eficiente para la conservación de las macrocápsulas. La mayoría de las macrocápsulas conservadas en refrigeración mantuvieron la viabilidad de *L. reuteri* DSPV002 por encima de la DMR entre los 70 y 105 d, pero algunas macrocápsulas mantuvieron los recuentos mayores a  $10^8$  Log UFC/cáp hasta los 140 d (G:A20PS 9:1 y G:A7,5PS 9:1 envasadas con y sin vacío) y G:A7,5PS 9:1 envasada en vacío, hasta los 210 d. El método de conservación que mantuvo mayor viabilidad por más tiempo fue la congelación, con macrocápsulas con recuentos por encima de  $10^8$  UFC/cáp entre 170 a 210 d, con excepción de G:A20M 9:1 envasadas con y sin vacío y G:A7,5M 9:1 sin vacío, las cuales mantuvieron valores superiores a la DMR hasta los 170 d. El almacenamiento de probióticos a baja temperatura ha demostrado ser efectivo durante mucho tiempo (Albadran, *et al.*, 2015; Heidebach, *et al.*, 2010), y para el mantenimiento de probióticos liofilizados, son recomendadas temperaturas de  $-18$  °C (Bruno y Shah, 2003).

Las macrocápsulas almacenadas en vacío, presentaron mejor viabilidad en comparación a las macrocápsulas sin vacío. El envasado en atmósfera modificada ofrece la posibilidad de extender la vida útil de los productos, al retrasar la tasa de respiración y la degradación enzimática de sustratos complejos (Kader 1986). Las cápsulas almacenadas sin protección del oxígeno, pueden haber sido afectadas porque la presencia de éste afecta a los microorganismos de diferentes maneras, puede ser tóxico directo, por producción de peróxidos tóxicos en su presencia y producción de radicales libres por oxidación de otros componentes (Korbekandi *et al.*, 2011).

La obtención de imágenes de diferentes cortes, nos permitió observar la estructura interna y externa de las macrocápsulas, así como la interacción de la matriz con los microorganismos. En

ambos tipos de macrocápsulas, se observó una clara predominancia de los microorganismos sobre las matrices. Esto es debido a la proporción utilizada para su formulación (9:1) con una alta carga de microorganismos en relación a la matriz. En la encapsulación de tipo matriz, en la que el agente activo (en nuestro caso los microorganismos) se encuentran dispersos en el material transportador, el agente activo está presente también en la superficie de la cápsula, en comparación a otros métodos de encapsulación, como el de tipo reservorio y el de matriz con recubrimiento externo, donde no están en contacto directo con el exterior (Burgain, *et al.*, 2011). La presencia de los microorganismos en la superficie externa de las cápsulas, es un factor que podría colaborar en la disminución de la viabilidad de la cápsula, sin embargo, los recuentos se mantienen por encima de la DMR en las condiciones de almacenamiento que hemos utilizado y descrito previamente.

El estudio de los materiales y combinación de estos en diferentes proporciones, nos permitió seleccionar las matrices de gelatina y almidón como la más apta para la conformación de las macrocápsulas. Luego, mediante la evaluación de los métodos de secado y diferentes proporciones de inóculo:matriz, pudimos determinar que G:A 9:1 fue la macrocápsula con mayor viabilidad de microorganismos luego del secado mediante liofilización. Finalmente, G:A7,5PS 9:1 envasadas al vacío y en temperaturas de congelación, fueron las macrocápsulas con mayor viabilidad luego de 210 d de almacenamiento, con 9,3 Log UFC/cáp.

## **5.2. Evaluación de la viabilidad bacteriana dentro de las macrocápsulas en condiciones gastrointestinales simuladas**

Para poder llegar al intestino en cantidades adecuadas y ejercer su efecto en el huésped, es necesario que los microorganismos probióticos sobrevivan al ambiente ácido del estómago (Li *et al.* 2011). La utilización de diferentes técnicas de encapsulación, protegen a los microorganismos del bajo pH, las sales biliares y otros compuestos que pueden encontrarse durante el tránsito (Muthukumarasamy *et al.*, 2006). Para resistir a las condiciones gastrointestinales, se utilizan polisacáridos y proteínas que actúan como agentes de protección y proporcionan una barrera física a las bacterias frente al ácido y a la bilis (Liu *et al.*, 2017).

Además de la naturaleza de los materiales utilizados para la encapsulación, también es importante el diseño de la forma y tamaño de las cápsulas. Un mayor tamaño de las cápsulas podría ser una ventaja a la hora de proteger a las bacterias del medio circundante, en comparación con las microcápsulas. Las macrocápsulas tienen una menor relación superficie/tamaño que las microcápsulas, por lo que la cantidad relativa de bacterias en la

superficie es menor, y por lo tanto, la cantidad de microorganismos en la superficie, expuestos en forma directa a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal es menor (Astesana, 2018). A su vez, es importante recalcar, que más allá de la protección ejercida por la macrocápsula, *L. reuteri* DSPV002C, es una cepa tolerante a los ácidos (Bertozzi, 2012), la cual es una de las características por la cual fue seleccionada como candidata para la conformación de un inóculo probiótico destinado a cerdos. Esta resistencia natural a las condiciones gastrointestinales fue evidenciada por la baja disminución de la viabilidad, aún en cultivo libre.

En este estudio se utilizaron macrocápsulas G:A7,5PS 9:1, con una alta concentración de microorganismos, y seleccionadas por la supervivencia de las mismas en el ensayo de viabilidad en el tiempo. En las determinaciones mediante recuento en placa, la viabilidad en JE y JI de *L. reuteri* fue mayor en las macrocápsulas que en forma de cultivo libre, observándose el efecto protector del encapsulamiento en el ambiente del estómago y el intestino. Otros estudios que han utilizado gelatina y almidón para encapsular bacterias probióticas también informaron efectos positivos de protección durante la digestión gastrointestinal (Alfaro-Galarza *et al.*, 2020; Desmond *et al.*, 2002; Lian *et al.*, 2003).

Además de la evaluación de la viabilidad en condiciones gastrointestinales simuladas a través del recuento en placa, se evaluó la misma por citometría de flujo. Mediante esta técnica, encontramos resultados no concordantes con los hallados en la técnica tradicional debido a que el efecto protector de la macrocápsula no pudo ser evidenciado. El hecho de que la técnica estándar y la citometría de flujo mostraran resultados similares en todos los tiempos estudiados hace suponer que aquellas bacterias en estado viable no cultivable puedan explicar esa discordancia. El fundamento del Kit LIVE/DEAD, es la utilización de 2 fluorocromos, Syto9 y IP, los cuales se unen a los ácidos nucleicos. Estos difieren en su capacidad para atravesar la membrana plasmática de los microorganismos. Syto9 atraviesa las membranas dañadas y las intactas, por lo tanto, tiñe células vivas y muertas. Las membranas son impermeables al IP, el cual es excluido en las células vivas, sólo atravesando en las bacterias con membranas dañadas. El IP posee una mayor afinidad por los ácidos nucleicos y reduce la fluorescencia verde de SYTO9 en las células muertas. Por lo tanto, mediante esta metodología las bacterias vivas con membranas intactas presentan fluorescencia verde, mientras que las bacterias muertas con membranas dañadas presentan fluorescencia roja (Berney *et al.*, 2007; Rüger *et al.*, 2014). Debido a que la determinación de la viabilidad mediante citometría de flujo se basa en la integridad de la membrana, esta técnica puede dar una respuesta diferente al recuento en placa. Cuando se habla de viabilidad, el término hace referencia a la capacidad para multiplicarse y ser cultivable,

condición indispensable para determinar viable a las células mediante recuento en placa. Sin embargo, en citometría de flujo, la definición de viabilidad está relacionada con la capacidad de una célula para realizar diversos aspectos de la funcionalidad metabólica, fisiológica y genética, manteniendo el grado de integridad estructural y morfológica (Kramer y Thielman, 2016), pero incluyendo también a aquellas que han perdido la capacidad de multiplicarse, estado al cuál se lo describe como viable no cultivable (VBNC) (Zhao *et al.*, 2017).

Solo un número limitado de estudios han comparado la viabilidad bacteriana mediante recuento en placa y citometría de flujo. Wilkinson, 2018 indica que en la producción de probióticos y procesos posteriores hay muchos factores que influyen sobre la viabilidad y las características de supervivencia que pueden afectar la relación entre el análisis mediante citometría y los recuentos en placa. Entre los principales factores la bibliografía cita el manejo de variables de proceso durante la fermentación, como el pH y el grado de incorporación de oxígeno, así como también la exposición a los procesamientos posteriores como los tratamientos térmicos. En este sentido, algunos autores han encontrado una alta correlación entre los recuentos en placa y los resultados obtenidos mediante citometría de flujo porque utilizaban cultivos frescos (Li *et al.*, 2016; Bunthof *et al.*, 2001) y otros han encontrado una baja correlación, ya que estudiaban microorganismos que habían pasado por algún tipo de procesamiento (Rulikowska *et al.*, 2013; Doolan *et al.*, 2014; Yanachkina *et al.*, 2016). En nuestro trabajo utilizamos macrocápsulas probióticas sometidas a procesos de congelación y liofilización, además de la conservación previa al ensayo, los cuales actuaron como estresores de la cepa benéfica y dar lugar a resultados no concordantes entre la pérdida de viabilidad entre ambos métodos.

### **5.3. Determinación de la viabilidad bacteriana en las macrocápsulas junto con el alimento peletizado**

Para poder definir el número de macrocápsulas a incorporar en la alimentación de los animales, hay que tener en cuenta la viabilidad de las mismas según la metodología de conservación. Otro factor a tener en cuenta es el tipo de crianza de los animales (individual o en grupo) para poder asegurar que cada animal reciba la DMR. En este estudio, las macrocápsulas almacenadas con el alimento, mantuvieron una viabilidad superior a la DMR entre 15 a 30 días, dependiendo de la atmósfera en la que ha sido almacenada. El envasado al vacío permitió mantener la DMR por macrocápsula durante más tiempo. Para poder asegurar una DMR por macrocápsula, si éstas son almacenadas en temperatura ambiente, deben ser consumidas dentro de ese periodo,

durante el cual mantienen  $10^8$  UFC/cáp y pueden ejercer su efecto probiótico. Una alternativa, puede ser la incorporación de un mayor número de macrocápsulas junto al alimento, para darle más vida de anaquel al producto. De esta manera, si bien las macrocápsulas van perdiendo viabilidad, al aumentar su número, se aseguraría un consumo de la DMR por más tiempo. En este caso, además, se encuentra la ventaja de que, al haber más macrocápsulas, es más probable que la distribución de las mismas en el alimento sea más homogénea y, por lo tanto, sea más equitativa su distribución entre los animales, permitiendo el consumo de cantidades de microorganismos más cercanos a la DMR. Si bien esta puede ser una opción de administración del probiótico en la granja, también es una limitante, ya que a medida que se va aumentando la vida de anaquel del producto, mayor es la cantidad de macrocápsulas que se deben incorporar. En el caso de los alimentos envasados sin vacío, las cantidades de macrocápsulas a incorporar aumentan considerablemente más que en los alimentos envasados con vacío.

Además de que las condiciones de vacío, aumentan significativamente la viabilidad de las macrocápsulas, también pudimos determinar, que el alimento (marca comercial), también influyó significativamente sobre la viabilidad de *L. reuteri* DSPV002C. La conservación exitosa de microorganismos probióticos es clave en el desarrollo de productos comerciales que deben conservar dichos microorganismos viables. Hay muchos factores que pueden afectar la viabilidad de los microorganismos al ser incorporados en alimentos, entre los más importantes podemos citar el pH del alimento, la presencia de compuestos químicos (peróxido de hidrógeno, oxígeno disuelto, metabolitos), la actividad de agua, la capacidad buffer del alimento y los ingredientes de éste (Vanderhoof, 2000; Donkor *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2011; Fonteles *et al.*, 2011; Costa, *et al.*, 2013). Las pequeñas diferencias en la composición de los alimentos estudiados fueron factores que determinaron un ambiente que favoreció o perjudicó la viabilidad celular. Por lo tanto, para poder determinar su inclusión en un alimento comercial, se debe evaluar su efecto sobre la viabilidad de *L. reuteri* DSPV002C y así poder definir la cantidad de macrocápsulas a incorporar y la vida de anaquel del producto.

Otra posible opción para mantener la viabilidad de las macrocápsulas es almacenarlas separadas del alimento, en las condiciones que asegure la mayor vida útil. En tal caso, es recomendable la conservación de las macrocápsulas envasadas al vacío, en refrigeración (vida útil: 210 d con 8,36 UFC/cáp) o mejor aún, en congelación (vida útil: 210 d con 9,3 UFC/cáp) y que las mismas sean incorporadas al alimento en el momento de administración a los animales.

## 5.4. Evaluación de los efectos probióticos del inóculo encapsulado en cerdos

### 5.4.1. Análisis microbiológicos en muestras de materia fecal

El establecimiento de la microbiota en los lechones comienza en el nacimiento, cuando el recién nacido es expuesto a una amplia variedad de microorganismos, proporcionados por la madre durante el parto y además del entorno circundante (Katouli *et al.*, 1997). La adquisición de la microbiota desde el nacimiento hasta el destete, está dada por el contacto con la materia fecal de la madre, su piel y mucosas (Thompson *et al.*, 2008). La composición de la microbiota juega un papel muy importante en el mantenimiento de la salud de los animales, interviene en la digestión de los alimentos para descomponer los productos, estimula el sistema inmune y compite con patógenos (Roselli *et al.*, 2017). Hay una sucesión de microorganismos en el tiempo, que pasan de aerobios en los recién nacidos a anaerobios estrictos en los adultos. Esta sucesión culmina en una comunidad clímax más equilibrada en los adultos (Kim *et al.*, 2011). Los cerdos dependen de productos finales de fermentación bacteriana en el colon para el 5-20% de su energía total (Gaskins *et al.*, 2002). La microbiota de los lechones está compuesta principalmente por BAL, bifidobacterias, estreptococos, clostridios y *E. coli* (Metzler y Mosenthin, 2008). El equilibrio entre microbios beneficiosos y dañinos refleja el estado de salud del animal (Dowarah *et al.*, 2017). Según Liao *et al.* (2017), los principales mecanismos de los probióticos para modular la microbiota en cerdos son dos. Uno de ellos es mediante exclusión competitiva, la cual consiste en proteger el intestino de la instalación de microorganismos nocivos, compitiendo por lugares de adhesión y por sustratos. El otro mecanismo es por inhibición antimicrobiana directa, por producción de sustancias bactericidas o bacteriostáticas contra microorganismo nocivos. En este estudio, evaluamos el efecto de *L. reuteri* encapsulado sobre la microbiota intestinal de los lechones durante la recría. Las poblaciones evaluadas a través de la materia fecal de los lechones fueron *E. coli*, levaduras, *Campylobacter* spp y BAL, además de la recuperación de la cepa probiótica administrada. Con respecto al inóculo probiótico resistente a rifampicina, el mismo se pudo recuperar a partir de la segunda semana solamente en el GP. Los recuentos entre 3,72 Log UFC/g y 5,93 Log UFC/g de *L. reuteri* durante las 6 semanas de duración del ensayo, demostraron que se pudo mantener una estabilidad de la cepa con una suplementación diaria igual o superior a 9,3 Log/cáp.

La suplementación con *L. reuteri* DSPV002C, no modificó la población BAL en los lechones. Las BAL son residentes del tracto gastrointestinal (GIT) de la mayoría de los animales y son efectivas para mantener el equilibrio favorable de la microbiota y así beneficiar la salud del huésped (Guo



*et al.*, 2010). En nuestro estudio, la falta de diferencia entre el GP y el GC, podría deberse a que con la suplementación probiótica con *L. reuteri* a los animales, se estarían desplazando a otras BAL del TGI de los cerdos. Esto provocaría que los cambios en la población de BAL totales no sean detectables mediante recuento en placa. De esta manera los recuentos totales de BAL se mantienen inalterados en el GP.

Para el caso de *E. coli*, los recuentos de esta población fueron mayores en 2 momentos del ensayo, el d 0 y el d 42, en ambos casos para el GP. Sin embargo, la diferencia en los recuentos de estos d, no fueron atribuibles al tratamiento probiótico. Otros autores han informado reducción en el recuento de *E. coli* tras la administración de diferentes géneros de *Lactobacillus spp.* En lechones, se cita la inhibición de la adhesión al epitelio del intestino delgado de *E. coli* por *Enterococcus faecium* (Bhandari *et al.*, 2010) y *Pediococcus acidilactici* (Daudelin *et al.*, 2011). Lv *et al.* (2015) en un estudio de administración de probióticos enriquecidos con selenio, encontraron mayores recuentos en *Lactobacillus* y reducción de *E coli*. Otro estudio informó que la utilización de *Lactobacillus rhamnosus* fue eficaz como terapia preventiva para la diarrea post-destete inducida por *E. coli*, posiblemente a través de la modulación de la microflora intestinal (Zhang *et al.*, 2010). Dong *et al.* (2013) informaron una disminución de *E. coli* en lechones alimentados con probióticos, con una mejor relación BAL/*E. coli*, sugerido como un indicador de la salud intestinal. En nuestro estudio, la suplementación con *L. reuteri* no modificó significativamente los recuentos de la población de *E coli*. La población de *Campylobacter spp.* no fue modificada por el consumo de *L. reuteri* DSPV002C. Bratz *et al.* (2015) indicaron que la colonización por *Campylobacter* en lechones ocurre tempranamente en la vida de los animales, siendo este un factor importante a considerar para definir el momento de comenzar a suplementar a los animales con los microorganismos. En su estudio no encontró diferencias en el tratamiento con probióticos frente a la inhibición de *Campylobacter*. Algunos estudios *in vitro* han evaluado la actividad inhibitoria de probióticos contra *Campylobacter* pero sin identificar la causa de la inhibición (Ushanov, 2018). Meremäe *et al.* (2010) atribuyen la inhibición al bajo pH causado por la producción de ácidos orgánicos por los probióticos. En la bibliografía, muchos estudios confirman la inhibición o la reducción del crecimiento de *Campylobacter* por probióticos en aves tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* (Messaudi *et al.*, 2011; Cean *et al.*, 2015; Arsi, *et al.*, 2015; Nishiyama *et al.*, 2014; Chaveerach *et al.*, 2004). Las levaduras son habitantes normales del aparato digestivo y son utilizadas como probióticos debido a que producen efectos benéficos sobre la salud (Vohra *et al.*, 2016). Estos microorganismos podrían tener efectos benéficos en el tratamiento de diarrea post destete (Trckova *et al.*, 2014) y podrían mejorar la conversión

alimenticia, la inmunidad sistémica y el desarrollo del intestino de lechones (Jiang *et al.*, 2015; van der Peet-Schwering *et al.*, 2007). En nuestro estudio, la población de levaduras, tampoco fue modificada por la suplementación probiótica. Una de las posibles razones de la falta de diferencias entre los GP y GC en las poblaciones de *E. coli*, Levaduras y *Campylobacter* spp., podría ser, las buenas condiciones de crianza y la dieta balanceada de los animales. Esta situación, colabora a que los animales se mantengan sanos y favorece el mantenimiento de un balance de la microbiota intestinal. Para poder detectar un efecto sobre estas poblaciones de microorganismos, serían necesarias situaciones de crianza que desestabilicen la microbiota del TGI.

En un estudio realizado por Mach *et al.* (2015) sobre el establecimiento temprano del microbioma intestinal en los cerdos, estos autores encontraron que los phylum *Firmicutes* y *Bacteroidetes* representaban más del 90% de las secuencias analizadas. Los otros phylum encontrados fueron *Proteobacteria* con 5,14%, *Spirochaetes* con 1,49% y *Fusobacteria* con 0,76%. Otro estudio realizado en lechones, encontró *Bacteroidetes* (56,8% del total), *Firmicutes* (36,6%) y *Proteobacteria* (4,8%) como los principales phylum de la microbiota (Poroyko *et al.*, 2010). Brousseau *et al.* (2015) en su estudio con dos cepas probióticas, encontró los mismos phylum dominantes a los 28 y 37 d de vida en los lechones. En nuestro estudio, al igual que estos autores, encontramos los phylum *Firmicutes* y *Bacteroidetes* en los 3 d de muestreo. Kim *et al.* (2011) afirmaron que esto es esperable, debido a la estricta condición anaeróbica del colon y al hecho de que los miembros de estos phylum están fuertemente compuestos por anaerobios. Además, encontramos en los 3 d de muestreo el phylum *Firmicutes* y en los d 21 y 42 el phylum *Actinobacteria*. Loof *et al.* (2014) informaron que estos 2 phylum junto con otros (*Fibrobacteres*, *Tenericutes* y *Planctomycetes*) se corresponden con menos del 1% de los phylum recuperados del TGI de los cerdos. Estos mismos autores citan a *Firmicutes* y *Proteobacteria* como los phylum más representativos. Por su parte Aydin *et al.* (2015) informaron como los phylum más representativos a *Firmicutes* y *Actinobacteria*. La diversidad en los resultados de estos autores, nos indican que la recuperación de los diferentes phylum es bastante variable. En nuestro estudio, encontramos en los 3 d evaluados, varios microorganismos no cultivables, Kim *et al.* (2011) encontró resultados similares, con un aumento de la proporción de bacterias no clasificadas a medida que los cerdos se hacían más grandes.

El phylum *Synergistetes* fue aislado los d 0 y 42, mientras que el d 21 no se encontró ningún representante de este phylum. Dentro de las bandas de este phylum, encontramos en el GC una banda compatible con *Cloacibacillus porcorum*, un microorganismo que degrada la mucina

presente en la superficie de los enterocitos y que utiliza sus componentes como única fuente de carbono (Looft *et al.*, 2013). La presencia de estos microorganismos podría alterar la barrera de protección del intestino y ser puerta de entrada para la colonización por patógenos.

Dentro del phylum *Firmicutes* encontramos varias bandas con representantes de la clase *Clostridia* en ambos grupos de estudio. Dentro de esta clase, en los 3 d encontramos bandas compatibles con la familia *Lachnospiraceae*, y una de estas, posiblemente *Blautia* sp. En humanos, *Lachnospiraceae* constituye una importante familia de la microbiota intestinal que degrada polisacáridos complejos a ácidos grasos de cadena corta (acetato, butirato y propionato) que el huésped puede utilizar para obtener energía (Biddle *et al.*, 2013). Dentro de la familia *Lachnospiraceae*, *Blautia* sp., puede proporcionar energía a partir de polisacáridos que otros microorganismos intestinales no pueden degradar (Flint *et al.*, 2008). La presencia de estos microorganismos podría ser una ventaja para la utilización de fuentes de energía no aprovechables por otros microorganismos. También se encontraron en los dos grupos, bandas de los 3 d con miembros pertenecientes a la familia *Ruminococcaceae* no cultivables y 2 perteneciente al género *Anaerotruncus* (1 en GC y 1 en GP). Varios miembros de la familia *Ruminococcaceae*, presentan un alto potencial para fermentar polisacáridos y proteína dietaria (Israeli-Ruimy *et al.*, 2017; Haq *et al.*, 2017).

Se aislaron también en los 3 d, bandas compatibles con el phylum *Bacteroidetes* y del orden *Bacteroidales*. Estos contribuyen a la degradación de los carbohidratos y evitan la colonización del intestino por bacterias patógenas mediante competencia (Kulagina *et al.*, 2012). Dos de las bandas presentaron similitud con *Barnesiella* sp., estas bacterias han demostrado en humanos que pueden eliminar y proteger el intestino contra el dominio de bacterias patógenas resistentes a los ATB (Ubeda *et al.*, 2013). Microorganismos del phylum *Bacteroidetes* poseen las enzimas necesarias para la conversión de polisacáridos a oligosacáridos mientras que el phylum *Firmicutes* está relacionado a los procesos metabólicos de absorción y fermentación de monosacáridos (Deustch *et al.* 2015). Por lo tanto, una comunidad bacteriana que incluya estos phylum podría tener un mejor aprovechamiento de los carbohidratos por los animales. En nuestro estudio, en el d 21, encontramos la presencia de los 2 phylum solamente en el GC, y luego en el d 42, solamente en el GP.

El phylum *Actinobacteria* fue recuperado el d 21 y 42 del ensayo. Se encontraron 4 bandas (2 en cada grupo) compatibles con *Olsenella* sp. y de éstas, 2 compatibles con *Olsenella umbonata*. Estas bacterias son ácido lácticas, fermentadoras de carbohidratos y han sido aisladas de rumen

de oveja y de yeyuno de cerdos (Kraatz *et al.*, 2011). Una banda correspondiente al GC fue compatible con *Bifidobacterium* sp., este género es uno de los componentes principales de la microbiota intestinal de los cerdos luego de *Lactobacillus* spp. (Mikkelsen *et al.*, 2003) y está asociado al consumo de leche, que estimula su crecimiento (Binda *et al.*, 2018). Otra banda del GC fue compatible con *Leucobacter* sp., microorganismo ya aislado en cerdos (Mann *et al.*, 2014; Jimenez *et al.*, 2014).

Los microorganismos recuperados de la secuenciación de las bandas, fueron variados y sin una diferenciación en los GC y GP, sin embargo, en el d 42, el GC presentó solamente representantes del phylum *Firmicutes*, mientras que el GP, tuvo representantes de 5 phylum diferentes, con una mayor diversidad.

En los dendrogramas, se observó una separación del d 0 respecto de los d 21 y 42 teniendo en cuenta ambos grupos. Esta modificación de la microbiota, podría estar dada por el cambio de alimentación de los animales, de una dieta láctea a una dieta sólida (Konstantinov *et al.*, 2006)., siendo más marcada en el GP que en el GC. Sin embargo, al evaluar solamente el CG, no se encontró un agrupamiento por clusters que separe los perfiles del d 0 del resto de los perfiles. En cambio, al evaluar la modulación de la microbiota a través del tiempo en el GP, se observó un claro agrupamiento de todos los perfiles del d0, separado el resto de los perfiles de los d 21 y 42. En este mismo sentido, también se encontró una disminución de los índices de riqueza y diversidad en el d 0 del GP con respecto a los d21 y 42 del mismo grupo. En cambio, los índices del GC se mantuvieron sin cambios a lo largo del tiempo.

En este estudio, encontramos que la principal diferencia en la modulación de la microbiota, estaría ocasionada por el cambio en la alimentación. Pero a su vez, la suplementación con *L. reuteri* DSPV002C podría tener una influencia en la modulación de la microbiota a lo largo del tiempo, lo cual fue evidenciado en el comportamiento diferencial entre el GP y el GC en los índices y dendrogramas, así como también por la mayor cantidad de *phylum* encontrados en el d 41 en el GP respecto del GC.

#### **5.4.2. Eritrograma y leucograma**

Los parámetros hematológicos son buenos indicadores del estado fisiológico de los animales (Khan y Zafar, 2005). Además, estos son útiles para el pronóstico de enfermedades, así como también para el monitoreo terapéutico y de la dieta que reciben los animales (Togun y Oseni,

2005). Los estudios de los parámetros sanguíneos, son de interés fisiológico para comprender la relación entre las características de la sangre y el ambiente (Isaac *et al.*, 2013). En este estudio, evaluamos el eritrograma y el leucograma de los lechones, durante los 42 días del ensayo. En el eritrograma, el único parámetro diferente entre los grupos fue el recuento de GR, siendo este mayor en el GC. Otros autores han encontrado resultados similares, Zhang *et al.* (2014) no encontraron diferencias en los recuentos de GR en lechones bajo tratamiento probiótico con *Enterococcus faecium*. Chen *et al.* (2005) tampoco encontraron diferencias en cerdos bajo tratamiento con 3 especies probióticas. Por otro lado, Upadhaya *et al.* (2017) encontraron un aumento del recuento de GR en lechones tras la administración de *Bacillus subtilis* en un desafío frente a *Salmonella*. Probablemente la diferencia encontrada en nuestro estudio sea debido a que los animales del GC, comenzaron el ensayo con un mayor recuento en este grupo. Se observaron también variaciones en el Hto y en la Hb en momentos puntuales, los d 0 y 35, no pudiendo relacionarse estas con un efecto de la administración del probiótico de *L reuteri* DSPV002C.

Togun *et al.* (2007) indicaron que cuando los valores sanguíneos disminuyen dentro del rango normal de la especie, la dieta no tuvo efectos adversos sobre los parámetros durante el periodo experimental, mientras que, si caen por debajo del rango, indican anemia. En nuestro estudio, el Hto, Hb y VCM se encontraron fuera de rango las primeras semanas del ensayo, pero luego se presentaron dentro de los rangos normales para la especie. La HCM y la CHCM, estuvieron por debajo del rango normal de la especie durante todo el ensayo. Estos valores bajos podrían estar indicando anemia por deficiencia de hierro (Starzyński *et al.*, 2013), pero como los demás valores se encontraron dentro de los rangos fisiológicos, esa posibilidad fue descartada.

En el leucograma de los lechones, la población de linfocitos y el total de células mononucleares (MN), fueron mayores en el GC que en el GP. Burdick Sanchez *et al.* (2018) encontraron resultados similares en los parámetros hematológicos en cerdos. Estos autores sugieren que la reducción de la serie blanca en el GP podría deberse a que la administración de probióticos estimula la migración de GB hacia el aparato digestivo. Las bacterias probióticas tienen la capacidad de interactuar con las células epiteliales del intestino, con las células dendríticas, los monocitos/macrófagos y los linfocitos (Bermudez Brito *et al.*, 2012). Las células dendríticas pueden ser activadas por los microorganismos probióticos, estimular la diferenciación de  $T_h$  y  $T_{reg}$  e iniciar una respuesta inhibitoria sobre la respuesta inflamatoria. Esta podría ser una explicación de un menor recuento de linfocitos en el GP. Sin embargo, no se puede descartar que las diferencias en el recuento sean a que los grupos presentaron diferencias desde el d 0. Prieto *et al.* (2014) también encontraron resultados similares, con menores recuentos de linfocitos y

además de monocitos en lechones tras la administración de *Bacillus sp.* Estos autores asocian niveles altos de estas líneas celulares como respuestas a infección, siendo estos niveles bajos asociados a animales sanos. El recuento de MN, incluye a los linfocitos y monocitos, de este modo, las diferencias encontradas a favor del GC en este parámetro, son debido a un mayor recuento de linfocitos. Los parámetros M, N, E y el conjunto de estos (PMN), no fueron modificados por la suplementación con *L. reuteri* DSPV002C. Otros autores tampoco encontraron diferencias en estos parámetros en lechones bajo tratamiento probiótico (Mair *et al.*, 2010; Yan y Kim, 2013; Tactacan *et al.*, 2016; Min *et al.*, 2019b; Miranda *et al.*, 2019). Chen *et al.* (2005) no encontraron diferencias en el tratamiento con diferentes cepas de *Lactobacillus* en cerdos en terminación sobre el recuento de GB, GR y Linfocitos. El autor sugiere que el tiempo de tratamiento (6 semanas) es muy corto para inducir algún cambio. Con respecto a los valores del leucograma hallados en el ensayo, los mismos se encontraron dentro de los rangos citados por otros autores (Cooper *et al.*, 2014; Semiadi *et al.* 2009) Si bien los resultados encontrados en este estudio son similares a los encontrados por otros autores, se deberían seguir evaluando en otras condiciones de crianza. En general, los parámetros sanguíneos que pueden indicar efectos inmunitarios, no cambian en animales criados en buenas condiciones de alimentación y ambiente (Min *et al.*, 2019a).

#### **5.4.3. Perfil de bioquímica sanguínea**

La determinación de la bioquímica sérica en los animales, refleja la respuesta fisiológica a su entorno interno y externo (Esonu *et al.*, 2001). Los valores de calcio, fósforo, FA, colesterol y triglicéridos obtenidos se encontraron dentro de los rangos informados por otros autores (Perri *et al.*, 2017; Egeli *et al.*, 1998). Las concentraciones séricas circulantes de colesterol y triglicéridos son el resultado de la absorción y producción por los tejidos lipogénicos y por ende de la dieta (Muñoz *et al.*, 2012). Los niveles altos de colesterol, están generalmente relacionados con la dieta, el manejo de los lípidos por el organismo y especialmente con la actividad hepática (Rauw *et al.*, 2007). Los probióticos tienen la capacidad de desconjugar enzimáticamente ácidos biliares, aumentando su tasa de excreción y el uso de colesterol para sintetizar nueva bilis, reduciendo el nivel del mismo en suero (Lye *et al.*, 2009). La eliminación de colesterol por *L. reuteri* está estrechamente relacionada con la actividad de enzimas hidrolasa de sales biliares (BSH) de las células, que hidrolizan el enlace amida de las sales biliares liberando los ácidos (Taranto *et al.*, 1999). Kumar *et al.* (2012) encontraron una reducción del colesterol en los cerdos tratados con probióticos y también reducción de triglicéridos. Nowak *et al.* (2019) informaron una de reducción

de los triglicéridos en suero con la administración de probióticos, pero a la vez informaron un aumento del colesterol sérico. En nuestro estudio, no encontramos diferencias entre los grupos con respecto a las concentraciones sanguíneas de colesterol. Resultados similares fueron publicados por Dlamini et al (2017) que tampoco encontró diferencias en el colesterol con el tratamiento probiótico. Con respecto a los triglicéridos, tampoco encontramos diferencias entre GC y GP. Resultados similares fueron encontrados por otros autores (Wang *et al.* 2014; Liu et al 2015). Ooi y Liong (2010), en su review citan una serie de factores por los cuales pueden no encontrarse diferencias en los perfiles lipídicos frente al tratamiento probiótico, entre ellos se citan la dosis administrada, duración del periodo de tratamiento y el tipo de cepa utilizada. En nuestro estudio, la falta de diferencias entre los grupos, podría deberse a los animales recibieron durante el ensayo una dieta balanceada, la cual no potenciaría el efecto probiótico de reducción de lípidos sanguíneos.

En este estudio también medimos las concentraciones sanguíneas de calcio, fósforo y fosfatasa alcalina. Algunas bacterias probióticas producen la enzima fitasa, que puede liberar minerales como fósforo y calcio secuestrados por el fitato, resultando en una mejor disponibilidad de estos minerales (Priyodip *et al.*, 2017; Parvaneh *et al.*, 2014). Por su parte, Eizaguirre *et al.* (2002) sugieren que la absorción de minerales como el calcio, hierro y magnesio se debe a la reducción del pH en el intestino por los probióticos, lo cual favorecería la absorción. Patiño *et al.* (2019) informaron un aumento de los niveles de calcio y fósforo en una dieta con *Bacillus subtilis*. Londoño y Parra (2015) también encontraron resultados similares utilizando *Enterococcus faecium* en la dieta de los animales. Hosseini *et al.* (2013) encontraron también mayores concentraciones de calcio y fosforo en aves tratadas con probióticos frente a los controles. En nuestro estudio, no encontramos un efecto con la suplementación probiótica sobre los valores sanguíneos de calcio, fósforo. Solamente la fosfatasa alcalina presentó niveles superiores al GP en el d 42 del ensayo, pero dentro de los valores fisiológicos para la especie. La FA puede alcanzar mayor actividad en animales jóvenes, detectándose valores altos en sangre, debido a que una de las isoenzimas se localiza en los osteoblastos y está relacionada con la calcificación y formación de estructuras óseas (Kaneko, 1971). En nuestro estudio es probable que no se haya encontrado un efecto del tratamiento con *L. reuteri* DSPV002C sobre estos metabolitos debido a que con la dieta de balanceados comerciales, los animales en crecimiento reciben niveles recomendados de calcio y fósforo según los requerimientos para la edad. De esta manera, la disponibilidad de estos minerales es la adecuada y no se potenciaría el efecto probiótico.

#### **5.4.4. Parámetros de crecimiento, eficiencia alimentaria y estado sanitario**

El crecimiento normal es la expresión del potencial genético promovido por factores internos y/o externos (Bauer *et al.*, 1998). El rendimiento en el crecimiento de los cerdos es muy importante desde el punto de vista económico y es uno de los indicadores claves que afectan la rentabilidad en la producción de carne porcina (Patil *et al.*, 2015) y la salud intestinal de los animales, se correlaciona con el rendimiento en el crecimiento (Valeriano *et al.*, 2017).

En la revisión bibliográfica, es escaso el material disponible sobre la utilización de medidas corporales para evaluar el efecto probiótico en cerdos. Zaragoza (2009) cita entre los parámetros para evaluar el crecimiento de los cerdos, los que utilizamos en este trabajo. Varios autores, citan las variables e índices zoométricos para la caracterización morfológica de cerdos de diferentes regiones (Estupiñán *et al.*, 2009; Olmos-Hernández *et al.*, 2009; Revidatti *et al.*, 2005). En nuestro ensayo, no se encontraron diferencias en el peso de los animales entre el GC y el GP, así como tampoco en las medidas corporales de altura a la cruz, ancho de cadera, ancho de hombros, largo dorsal y perímetro torácico. En otras especies, se ha informado el efecto del tratamiento probiótico sobre algunos de estos parámetros. Marín *et al.* (2012) encontraron que los terneros tuvieron mejor ganancia de peso y mayor altura a la cruz en el grupo que consumió probióticos. Knudsen (2000) también informa mejoras en parámetros de crecimiento en terneros con la suplementación probiótica. En otro estudio, García *et al.* (2017) encontró diferencias en la ganancia de peso de terneras suplementadas con probióticos, pero sin diferencias en la altura entre los grupos.

La mejora en el balance de los microorganismos intestinales por la implementación de probióticos, se ve reflejado en el incremento de la ganancia de peso y en la disminución de la conversión alimenticia de los animales (Nazef *et al.*, 2008). Muchos estudios han demostrado que el peso al destete influye en el rendimiento durante las fases posteriores de crecimiento y hasta en la terminación (Le Dividich y Seve, 2000). Muchos autores han informado una mejora en la ganancia de peso y en la eficiencia de conversión en cerdos con la implementación de diferentes microorganismos (Ayala *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Suda *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2008; Bocourt *et al.*, 2004; Alexopoulos *et al.*, 2004). Chang *et al.* (2001) informaron una mejor conversión alimenticia en cerdos con la utilización de *L. reuteri*. Otro autor encontró una mejora en la ganancia de peso y en la conversión alimenticia durante las 2 primeras semanas luego del destete (Giang *et al.*, 2001). Un estudio realizado por Lázaro *et al.* (2005) encontró un mejor peso al nacimiento de la camada de lechones en cerdas que consumieron



probiótico durante la gestación, pero este no afectó el consumo de alimento de las cerdas ni la ganancia de peso de los lechones. En un meta-análisis sobre la GDP y la eficiencia de conversión en cerdos suplementados con probiótico realizada por nuestro equipo (Zimmermann *et al.* 2016), encontramos que el efecto probiótico sobre la ganancia de peso es más evidente durante el primer periodo de la crianza, así como también en la terminación. Con respecto a la eficiencia de conversión, en el meta-análisis se encontró un efecto positivo con la implementación de probiótico en todos los periodos de crecimiento de los animales. La edad en la que administramos el inóculo a los cerdos en nuestro ensayo, se encontraba dentro de los grupos etarios en los cuales la suplementación probiótica mostró efectos positivos en la GDP y en la eficiencia de conversión en el meta-análisis. Sin embargo, en nuestro estudio, no encontramos mejoras en estos dos parámetros con la suplementación probiótica. Tampoco encontramos diferencias entre GC y GP en el consumo de alimento, siendo similar en ambos grupos durante el ensayo. Resultados similares fueron informados por otros autores que tampoco encontraron mejoras en índices de conversión alimenticia y en ganancia de peso de los animales (Speiser *et al.*, 2015; Veizaj-Delia *et al.*, 2010). La implementación de una dieta balanceada *ad libitum* y la falta de competencia por el alimento en las condiciones de crianza durante el ensayo, podrían ser algunas de las razones por la cual no se encontraron diferencias entre los grupos.

El ecosistema del TGI de los lechones sufre cambios importantes durante los primeros días luego del destete, esto crea una posible puerta de entrada para el crecimiento de patógenos y el desarrollo de diarrea (Hopwood y Hampson, 2003). La optimización del ecosistema gastrointestinal, sobre todo durante el periodo de transición del destete, junto con el ajuste de factores ambientales, sociales y de nutrición es de suma importancia para prevenir la diarrea y sus consecuencias en la salud y el rendimiento de los animales (Taras *et al.*, 2005). La implementación de probióticos podría ser una medida de protección para mejorar la incidencia de diarrea después del destete (Prieto *et al.*, 2014). Muchos estudios han demostrado que la implementación de cepas probióticas durante el periodo de destete reduce la incidencia de diarrea, así como la duración de la misma (Li *et al.*, 2019; Dowarah *et al.*, 2017; Rondón *et al.*, 2013; Papatsiros *et al.*, 2011; Pieper *et al.*, 2010; Bocourt *et al.*, 2004). En nuestro estudio, no hubo animales enfermos o con signos clínicos durante el estudio. La presencia de casos aislados de score 3 y 4, podrían estar más relacionados a los cambios de dieta que tuvieron los animales durante el periodo de crianza. El cambio en la dieta de los animales, puede provocar un desequilibrio nutricional causante de irritación y/o con un incremento de la presión osmótica luminal con la consecuente diarrea (Pluske *et al.*, 2002). Estos resultados son un reflejo del buen

estatus sanitario en los animales durante el estudio. Probablemente no pudo observarse ningún efecto probiótico entre los grupos debido a las condiciones de crianza durante el ensayo, ya que estos fueron criados en buenas condiciones sanitarias, con correcta limpieza y desinfección de las jaulas. Además, si bien la selección de los animales para el ensayo fue al azar, se seleccionaron aquellos que estaban sanos y sin signos de enfermedad. La posibilidad de que los animales enfermen se reduce también debido a la ausencia o reducción de factores estresantes en las condiciones de crianza de un estudio controlado, que puedan potenciar la enfermedad en estos. Es importante destacar, que el efecto probiótico, suele medirse más fácilmente cuando los animales sufren estrés, que cuando están criados en buenas condiciones sanitarias.

#### **5.4.5. Monitoreo de *L. reuteri* mediante PFGE**

La utilización de PFGE para el análisis de los patrones de restricción de ADN cromosómico ha sido utilizado ampliamente en *Lactobacillus* spp. como la técnica más apropiada para el genotipado de aislamientos bacterianos (Jacobsen *et al.*, 1999) así como también para la tipificación de bacterias patógenas (Gosiewski *et al.*, 2015). Tareb *et al.* (2015) utilizaron la técnica de PFGE con dos endonucleasas (*NotI* y *Apal*) para evaluar dos morfotipos diferentes de *Lactobacillus farciminis* encontrando que ambas tienen el mismo patrón de bandas. Letellier *et al.* (2000) utilizaron la enzima *SpeI* para comparar el perfil de 2 cepas de *Salmonella* aisladas de diferentes animales demostrando con esta técnica que las cepas tenían el mismo perfil. Hur *et al.* (2011) compararon 42 muestras de dos periodos de aislamiento de *Salmonella* recuperadas desde lechones con diarrea de diferentes lugares mediante PFGE encontrando similitudes en los perfiles, estando las cepas relacionadas entre ellas. En este estudio, no se encontraron diferencias entre las bandas de las diferentes muestras, presentándose solo 1 pulsotipo. Las bandas presentaron una similitud del 100%, confirmando que la recuperación de los aislamientos en las diferentes semanas, así como la cepa resistente, la de macrocápsula y la cepa wildtype del estudio era la misma cepa. Blajman *et al.* (2015) encontraron resultados similares utilizando la enzima *SmaI* para comparar la cepa *Lactobacillus salivarius* resistente a rifampicina recuperada desde el TGI de pollos con la cepa administrada, así como también con la forma no resistente, demostrando que era la misma cepa en todos los casos. Esta enzima de restricción ha sido utilizada también para otras cepas de *L. reuteri*. Langa *et al.* (2013) utilizó las enzimas *Apa I* y *Sma I* para caracterizar mediante PFGE de 7 cepas de *L. reuteri*. La obtención de perfiles similares en cada uno de los aislamientos recuperados desde diferentes matrices, nos permite

establecer que el método de monitoreo de clones resistentes mediante LAMVAB con rifampicina fue adecuado a nuestro propósito.

#### **5.4.6. Histomorfometría del intestino**

La principal función del TGI es permitir la digestión y absorción de sustancias a la circulación, pero también cumple la función de eliminar compuestos patógenos (Gaskins, 1997). Antes del destete, las vellosidades intestinales son largas, bien desarrolladas y muy eficientes en la absorción de nutrientes (Galeano *et al.*, 2016). Los lechones, luego del destete a menudo exhiben atrofia de vellosidades (reducción de su altura) e hiperplasia de criptas (disminución de la profundidad) (Pluske *et al.*, 1996; Loh *et al.*, 2002). Según Rodríguez *et al.* (2007) esa atrofia se debe al cambio repentino de dieta y a la baja ingesta de alimentos. Mc Cracken y Kelly (1984) explicaron la atrofia por una inanición temporal debida al destete, lo cual reduce el contenido de proteínas de la mucosa con una reducción de las enzimas digestivas. La suplementación con probióticos, aumenta la ingesta diaria de alimento y esto tiene un efecto positivo sobre el desarrollo del epitelio intestinal (Dowarah *et al.*, 2017). Mair *et al.* (2010) encontraron que la suplementación probiótica a cerdos mostró una mayor altura de vellosidades y profundidad de criptas, mientras que la relación altura/profundidad fue menor en comparación al grupo control. Suo *et al.* (2012) encontraron resultados similares con la suplementación probiótica. Budiño *et al.* (2005) informaron una mejor densidad de microvellosidades en lechones tratados con probióticos luego de 14 d de destete en comparación a otros tratamientos. En nuestro estudio, no encontramos diferencias en la altura de las vellosidades y en la profundidad de las criptas entre los grupos. No obstante, el aumento en la relación V/C encontrado en los cerdos del GP podría ser explicado por el efecto de la cepa inoculada y sus metabolitos ácidos que favorecen el desarrollo de las vellosidades intestinales. Es probable que un efecto probiótico más marcado no haya sido observado en nuestro ensayo, debido a que el sacrificio de los lechones fue realizado luego de 42 d. Los lechones fueron destetados a los  $28 \pm 1$  d de vida, llegando a la necropsia con  $70 \pm 1$  d. Si el efecto del tratamiento probiótico es observable en la morfología intestinal sobre el momento crítico del destete y los primeros días luego de este, es probable que luego de 42 d de tratamiento, la mucosa ya se haya recuperado y si bien pudo haber un efecto del tratamiento probiótico, ya no es apreciable.

## **6. Conclusiones**

- La gelatina y el almidón pregelificado fueron los materiales con las características físicas más adecuadas para la conformación de matrices homogéneas, firmes y fácilmente manipulables.
- La liofilización fue el método que permitió obtener las matrices con las características deseadas relacionadas a la estructura, el color, la homogeneidad y la baja adhesividad después del secado de sus componentes (gelatina y almidón), los cuales pueden ser utilizados en macrocápsulas transportadoras de microorganismos probióticos.
- Las macrocápsulas con proporción de inóculo:matriz 9:1, tanto en gelatina 5% p/v + almidón 2,5% p/v (G:A7,5) como en gelatina 10% p/v + almidón 10% p/v (G:A20) fueron las que mantuvieron la mayor cantidad de microorganismos probióticos viables luego del secado mediante liofilización. La utilización del permeado de suero (PS) como crioprotector al 10% p/v, permitió una mayor viabilidad de los microorganismos encapsulados en comparación con el empleo de maltodextrina (M).
- La temperatura de almacenamiento que mantuvo más alta la viabilidad fue la congelación. Durante el almacenamiento en estas condiciones, las macrocápsulas G:A7,5PS 9:1 conservadas bajo vacío, fueron las que mantuvieron los mayores recuentos de bacterias viables (9,3 Log UFC/cáp) hasta los 210 d de almacenamiento. En condiciones de refrigeración, estas mismas macrocápsulas, envasadas al vacío, fueron las únicas que mantuvieron la viabilidad del inóculo probiótico por encima de la DMR durante 210 d. A temperatura ambiente, el tiempo de almacenamiento para mantener la viabilidad por encima de la DMR fue de 35 d tanto para las macrocápsulas conservadas bajo vacío (G:A7,5PS 9:1; G:A20PS 9:1) como para las conservadas sin vacío (G:A20PS 9:1; G:A7,5M 9:1).
- La macrocápsula G:A7,5PS 9:1 fue capaz de proteger al inóculo *L. reuteri* DSPV002C, mostrando pérdidas de viabilidad de  $0,58 \pm 0,09$  Log UFC/ml comparado con  $1,56 \pm 0,16$  Log UFC/ml obtenido en el cultivo libre luego de 6 h de incubación en dichas condiciones. La viabilidad de *L. reuteri* DSPV002C mediante citometría de flujo no tuvieron concordancia con los resultados obtenidos mediante recuento en placa en condiciones gastrointestinales simuladas.
- La viabilidad de *L. reuteri* DSPV002C encapsuladas en G:A7,5PS 9:1 adicionadas al alimento peletizado para cerdos, almacenada a temperatura ambiente fue influenciada por el alimento (marca comercial) en el cual fue incorporada la cepa y mejoró bajo condiciones de vacío.

- La cepa probiótica administrada a lechones durante 42 d, no modificó las poblaciones de BAL, *E. coli*, *Campylobacter* spp. y levaduras en materia fecal. No obstante, el cambio de dieta en los animales inmediatamente posterior al destete tuvo un efecto modulador sobre la microbiota intestinal y la suplementación con *L. reuteri* DSPV002C podría tener una influencia en esta modulación.
- La cepa probiótica fue recuperada tanto desde las macrocápsulas como desde la materia fecal de los cerdos por lo que el método de monitoreo de clones resistentes mediante LAMVABrif fue adecuado a nuestro propósito.
- La suplementación con *L. reuteri* DSPV002C no modificó los parámetros sanguíneos y de crecimiento en los animales. El aumento en la relación V/C en el duodeno encontrado en los cerdos del GP podría ser explicado por el efecto de la cepa inoculada y sus metabolitos ácidos que favorecen el desarrollo de las vellosidades intestinales. Es probable que un efecto probiótico mas marcado no haya sido observado en nuestro ensayo, debido a que el sacrificio de los lechones fue realizado luego de 42 d.
- Sería interesante realizar otros ensayos en donde se evalúe el efecto *in vivo* en cerdos bajo condiciones de estrés o experimentalmente infectados por patógenos para poder evaluar el potencial del probiótico bajo esas circunstancias.

## **7. Bibliografía**

- Ahmed S, Hoon, J, Hong-Seok M, Chul-Ju Y. 2014. Evaluation of *Lactobacillus* and *Bacillus*-based probiotics as alternatives to antibiotics in enteric microbial challenged weaned piglets. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8:96–104.
- Albadran HA, Chatzifragkou A, Khutoryanskiy VV, Charalampopoulos D. 2015. Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. *Int. Food Res. J.* 74:208--216.
- Alexopoulos C, Georgoulakis IE, Tzivara A, Kyriakis CS, Govaris A, Kyriakis SC. 2004. 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.* 51:306–312.
- Alfaro-Galarza O, López-Villegas EO, Rivero-Perez N, Tapia- Maruri D, Jiménez-Aparicio AR, Palma-Rodríguez HM, Vargas-Torres A. 2020. Protective effects of the use of taro and rice starch as wall material on the viability of encapsulated *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei*, *LWT*. En prensa.
- Anandharamakrishnan C, Rielly CD, Stapley AGF. 2010. Spray-freeze-drying of whey proteins at sub-atmospheric pressures. *Dairy Science & Technology.* 90:2-3
- Apic I, Savic B, Stancic I, Zivkov-Balas M, Bojkovski J, Jovanovic S, Radovic I, Zvekcic D, Maksimovic Z, 2014. Litters health status and growth parameters in the sows feeding diets supplemented with probiotic actisaf Sc47® within pregnancy or lactation. En: *Proceedings of the International Symposium Animal Science. Belgrade 2014.*
- Arepally D, Goswami TK. 2019. Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. *LWT.* 99:583-593.
- Arsi K, Donoghue AM, Woo-Ming A, Blore PJ, Donoghue DJ. 2015. The efficacy of selected probiotic and prebiotic combinations in reducing *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *J Appl Poult Res.* 24:327-334.
- Ashraf R, Shah NP. 2011. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaris*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium spp. in yoghurt*—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 149:194–208.
- Ashwar BA, Gani A, Shah A, Masoodi FA. 2018. Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics. *Food Chem.* 239:287-294.
- Astesana DM, Zimmermann JA, Frizzo LS, Zbrun MV, Blajman JE, Berisvil AP, Romero-Scharpen A, Signorini ML, Rosmini MR, Soto LP. 2018. Development and storage



- studies of high density macrocapsules containing *Lactobacillus* spp. strains as nutritional supplement in young calves. *Rev Argent Microb.* 50(4):398-407.
- Astesana DM. 2018. Utilización de microorganismos benéficos para reducir la diseminación de patógenos alimentarios durante la crianza de terneros. Tesis Doctoral. Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Universidad Nacional del Litoral.
  - Ayala L, García-Hernández Y, Savón LL, Boucourt R, Castro M, Herrera M. 2014. Evaluación de la actividad probiótica del *Lactobacillus pentosus* en indicadores de salud y productivos de cerditos destetados. *Revista Computadorizada de Producción Porcina Volumen.* 21:3.
  - Aydin S, Shahi A, Ozbayram EG, Ince B, Ince O. 2015. Use of PCR-DGGE based molecular methods to assessment of microbial diversity during anaerobic treatment of antibiotic combinations. *Bioresour. Technol.* 192:735-740.
  - Bager F, Aarestrup FM, Wegener HC. 2000. Dealing with antimicrobial resistance the Danish experience. *Can. J. Anim. Sci.* 80: 223-228.
  - Bajagai YS, Klieve AV, Dart PJ, Bryden WL. 2016. Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation. H.P.S. Makkar. *FAO animal production and health paper No. 179.* Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i5933e.pdf>.
  - Baker AA, Davis E, Spencer JD, Moser R, Rehberger T. 2013. The effect of a *Bacillus*-based direct-fed microbial supplemented to sows on the gastrointestinal microbiota of their neonatal piglets. *J. Animal Sci.* 91:3390–3399.
  - Barba-Vidal E, Martín-Orúe SM, Castillejos L. 2019. Practical aspects of the use of probiotics in pig production: A review. *Livestock Science.* 223:84-96.
  - Bauer R, Walter B, Hoppe A Gaser E, Lampe V, Kauf E, Zwiner U. 1998, Body weight distribution and organ size in newborn swine (*Sus scrofa domestica*) – a study describing an animal model for asymmetrical intrauterine growth retardation. *Exp Toxicol Pathol.* 50:59–65.
  - Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. 2012. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab.* 61:160–74.
  - Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU, Egli T. 2007. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(10):3283-3290.
  - Bertozzi E. 2012. Selección de microorganismos indígenas mediante pruebas in vitro para mejorar el estado sanitario y la performance de crecimiento durante la crianza

- intensiva de cerdos. Tesis de Maestría. Departamento de Salud Pública. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral.
- Bhandari, SK, Opapeju FO, Krause DO, Nyachoti CM. 2010. Dietary protein level and probiotic supplementation effects on piglet response to *Escherichia coli* K88 challenge: performance and gut microbial population. *Livestock Science* 133:185–188.
  - Biddle A, Stewart L, Blanchard J, Leschine S. 2013. Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* in diverse gut communities. *Diversity*. 5:627–640.
  - Binda C, Lopetuso LR, Rizzatti G, Gibiino G, Cennamo V, Gasbarrini A. 2018. *Actinobacteria*: a relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Dig Liver Dis*. 50:421-428.
  - Blajman, J.E., Gaziano, C.G., Zbrun, M.V., Soto, L.P., Astesana, D.M., Berisvil, A.P., Romero Scharpen, A., Signorini, M.L., Frizzo, L.S. 2015. In vitro and in vivo screening of native lactic acid bacteria towards their selection as a probiotic in broilers. *Research in Veterinary Science*, 101: 50-56.
  - Bocourt R, Savón L, Díaz J, Brizuela MA, Serrano P, Prats A y Elias A. 2004. Efecto de la actividad probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* en indicadores productivos y de salud de cerdos jóvenes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 38(1):79-83.
  - Bogere P, Choi YJ, Heo J. 2019. Probiotics as alternatives to antibiotics in treating post-weaning diarrhoea in pigs. *S. Afr. j. anim. sci.* 49(3):403-416.
  - Bohmer BM, Kramer W, Roth-Maier DA. 2006. Dietary probiotic supplementation and resulting effects on performance, health status, and microbial characteristics of primiparous sows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 90:309–315.
  - Bratz K, Gölz G, Janczyk P, Nöckler K, Alter T. 2015. Analysis of in vitro and in vivo effects of probiotics against *Campylobacter* spp. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 128(3-4):155-62.
  - Broeckx G, Vandenheuvel D, Claes IJJ, Lebeer S, Kiekens F. 2016. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *Int. J. Pharm.* 505(1–2):303-318.
  - Brousseau, J, Talbot G, Beaudoin F, Lauzon K, Roy D, Lessard, M. 2015. Effects of probiotics *Pediococcus acidilactici* strain MA18/5M and *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *boulardii* strain SB-CNCM I-1079 on fecal and intestinal microbiota of nursing and weanling piglets. *Anim. Sci. J.* 93:5313–5326.

- Bruno FA, Shah NP. 2003. Viability of two freeze-dried strains of Bifidobacterium and commercial preparations at various temperatures during prolonged storage. J. Food Sci. 68:2336–2339u
- Budiño FEL, Thomaz MC, Kronka RN, Nakaghi LSO, Tucci FM, Fraga AL, Scandolera AJ, Huaynate RAR. 2005. Effect of probiotic and prebiotic inclusion in weaned piglet diets on structure and ultra-structure of small intestine. Braz Arch Biol Technol. 48(6):921-929.
- Bunthof CJ, Bloemen K, Breeuwer P, Rombouts F M, Abee T. 2001. Flow cytometric viability of lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 67:2326–2335.
- Burdick-Sanchez NC, Carroll JA, Broadway PR, Bass BE, Frank JW. 2018. Modulation of the acute phase response following a lipopolysaccharide challenge in pigs supplemented with an all-natural *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product. Livest. Sci. 208:1-4.
- Burgain JJ, Gaiani CC, Linder MR, Scher JJ. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications J. Food Eng. 104(4):467-483.
- Carroll, JA. 2003. Can subtherapeutic levels of antibiotics be eliminated from swine diets. Adv. Pork Prod. 14:151-158.
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P. 2004. Effects of Various Sugars Added to Growth and Drying Media upon Thermotolerance and Survival throughout Storage of Freeze-Dried lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus. Biotechnology Progress. 20(1):248—254.
- Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P, Phillips I. 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. J. Antimicrob. Chemother. 52: 159-161.
- Cean A, Stef L, Simiz E, Julean C, Dumitrescu G, Vasile A, Pet A, Drinceanu A, Corcionivoschi N. 2015. Effect of human isolated probiotic bacteria on preventing Campylobacter jejuni colonization of poultry. Foodborne Pathog Dis. 12:122-130.
- Černauskienė J, Bartkevičiūtė Z, Hammerer J, Kozłowski K, Jeroch H. 2011. The effect of 'Bonvital', a probiotic product containing *Enterococcus faecium* on the fattening performance, carcass characteristics and meat quality of pigs under production conditions. Vet. Med. Zoot. 54:20–25.
- Chaikham P. 2015. Stability of probiotics encapsulated with Thai herbal extracts in fruit juices and yoghurt during refrigerated storage. Food Biosci. 12:61-66.

- Champagne CP, Fustier P. 2007. Microencapsulation for delivery of probiotics and other ingredients in functional dairy products. En: Saarela M. Functional dairy products. 2nd ed. UK, Woodhead Publishing. pp 404-426.
- Champagne CP, Kailasapathy K. 2008. Encapsulation of probiotics. En: Garti N. Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals. Woodhead publishing Ltd., Cambridge, UK, pp. 344–369.
- Champagne P, Gardner NJ, Roy D. 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. Crit Rev Food Sci Nutr. 45:61-84.
- Chang YH, Kim JK, Kim HJ, Kim WY, Kim YB, Park YH. 2001. Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent in vivo studies. Ant. Van Leeuwenhoek. 80(2):193-199.
- Chaveerach P, Lipman LJ, Van Knapen P. 2004. Antagonistic activities of several bacteria on in vitro growth of 10 strains of *Campylobacter jejuni/coli*. Int. J. Food Microbiol. 90:43-50.
- Chen YJ, Min BJ, Cho JH, Kwon OS, Son KS, Kim HJ, Kim IH. 2006. Effects of dietary Bacillus-based probiotic on growth performance, nutrients digestibility, blood characteristics and fecal noxious gas content in finishing pigs. Asian Australas J Anim Sci. 19:587–592.
- Chen YJ, Son KS, Min BJ, Cho JH, Kwon OS, Kim IH. 2005. Effects of dietary probiotic on growth performance, nutrients digestibility, blood characteristics and fecal noxious gas content in growing pigs. Asian-Aust J Anim Sci. 18:1464-1468.
- Close WH. 2000. Producing pigs without antibiotics growth promoters. Adv. Pork Prod. 11:47-56.
- Collado MC, Gueimonde M, Salminen S. 2010. Probiotics in adhesion of pathogens: mechanisms of action. En: Bioactive foods in promoting health: probiotics and prebiotics. Watson RR, Preedy VR. 1st ed. London. Academic Press, Elsevier. P:353–370.
- Cooper CA, Moraes LE, Murray JD, Owens SD. 2014. Hematologic and biochemical reference intervals for specific pathogen free 6 week old Hampshire Yorkshire crossbred pigs. J Anim Sci Biotechnol. 5(1):5.
- Costa MGM, Fonteles TV, deJesus ALT, Rodrigues S. 2013. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: process optimisation and product stability. Food Chem. 139(1-4):261-266.
- Cromwell GL. 2002. Why and how antibiotics are used in swine production. Anim Biotechnol. 13:7–27.

- D'Amelio P, Sassi F. 2017. Gut microbiota, immune system, and bone. *Calcif Tissue Int.* 102(4):415–25.
- Dafe A, Etemadi H, Dilmaghani A, Mahdavinia GR. 2017. Investigation of pectin/starch hydrogel as a carrier for oral delivery of probiotic bacteria. *Int. J. Biol. Macromol.* 97:536-543.
- Daudelin JF, Lessard M, Beaudoin F, Nadeau E, Bissonnette N, Yvan Boutin, Brousseau JP, Lauzon K, Fairbrother JM. 2011. Administration of probiotics influences F4 (K88)-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* attachment and intestinal cytokine expression in weaned pigs. *Vet Res.* 42:69
- Davis, ME, Parrott T, Brown DC, de Rodas BZ, Johnson ZB, Maxwell CV, Rehberger T. 2008. Effect of a *Bacillus*-based direct-fed microbial feed supplement on growth performance and pen cleaning characteristics of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 86:1459–1467.
- De Man JD, Rogosa M, Sharpe ME. 1960. A médium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130 - 135.
- De Vos P, Faas MM, Spasojevic M, Sikkema J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int Dairy J.* 20(4):292–302.
- Demecková V, Kelly D, Coutts AGP, Brooks PH, Campbell A. 2002. The effect of fermented liquid feeding on the faecal microbiology and colostrum quality of farrowing sows. *Int J Food Microbiol.* 79: 85-97.
- Desmond C, Ross RP, O'Callaghan E, Fitzgerald G, Stanton C. 2002. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *J. Appl. Microbiol.* 93:1003–1011.
- Deusch S, Tilocca B, Camarinha-Silva A, and Seifert J. 2015. News in livestock research – use of Omics-technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 13:55–63.
- Dias DR, Botrel DA, De Barros Fernandes RB, Borges SV. 2017. Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. *Curr Opin Food Sci.* 13:1-37.
- Diaz-Gomez L, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C, García-González CA. 2016. Growth Factors Delivery from Hybrid PCL-Starch Scaffolds Processed Using Supercritical Fluid Technology. *Carbohydr. Polym.* 142:282–292.

- Dlamini ZC, Langa RLS, Aiyegoro OA, Okoh AI. 2017. Effects of probiotics on growth performance, blood parameters, and antibody stimulation in piglets. *S. Afr. J. anim. sci.* 47:6.
- Doherty SB, Gee VL, Ross RP, Stanton C, Fitzgerald GF, Brodtkorb A. 2011. Development and characterization of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocoll.* 25:1604–1617.
- Dong X, Zhang N, Zhou M, Tu Y, Deng K, Diao, Q. 2013. Effect of dietary probiotics on growth performances, fecal microbiota and serum profiles in weaned piglets. *Anim. Prod. Sci.* 54:1-6.
- Donkor ON, Henriksson A, Vasiljevic T, Shah NP. 2006. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *Int. Dairy J.* 16:1181–1189.
- Doolan IA, Nongonierma AB, Kilcawley KN, Wilkinson MG. 2014. Partitioning of starter bacteria and added exogenous enzyme activities between curd and whey during Cheddar cheese manufacture. *Int. Dairy J.* 34:159–166.
- Doulgeraki AI, Paramithiotis S, Kagkli DM, Nychas GJ. 2010. Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Food Microbiol.* 27:1028-1034.
- Dowarah R, Verma AK, Agarwal N. 2017. The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review. *Anim. Nutr.* 3(1):1-6.
- Doyle ME. 2001. Alternatives to antibiotic use for growth promotion in animal husbandry. Food Research Institute briefings, University of Wisconsin, Madison.
- Egili AK, Framstad T, Morberg H. 1998. Clinical biochemistry, haematology and body weight in piglets. *Acta vet scand.* 39:381-393.
- Ehrmann MA, Kurzak P, Bauer J, Vogel RF. 2002. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J. Appl. Microbiol.* 92: 966-975.
- Eizaguirre , Urkia, NG, Asensio AB, Zubillaga I, Zubillaga P, Vidales C, Garcia-renzana JM, Aldazabal P. 2002. Probiotic supplementation reduces the risk of bacterial translocation in experimental short bowel syndrome. *J. Pediatr. Surg.* 37:699-702.
- Eratte D, McKnight S, Gengenbach TR, Dowling K, Barrow CJ, Adhikari BP. 2015. Co-encapsulation and characterization of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate–gum Arabic complex coacervates. *J. Funct. Foods*, 19:882-892.
- Esonu BO, Emenalom DD, Udedibie ABI, Okoli IC, Herbert U, Ekpor CF. 2001. Performance and blood chemistry of weaner pigs fed raw *Mucuna* bean (velvet bean) meal. *Trop Anim Prod Invest.* 4:49–54.

- Estanguet A, Parada J, Carranza A, Camacho P, Busso J. 2016. Escala objetiva para la caracterización de la materia fecal de cerdos en engorde. XIII Congreso Nacional de Producción Porcina, XIX Jornadas de Actualización Porcina. VIII Congreso de Producción Porcina del Mercosur - Río Cuarto. 2016. p 144.
- Estupiñán K, Vasco D, Barreto S, Zambrano K. 2009. Estudio morfoestructural de una población de cerdos naturalizados en los cantones Valencia y la Maná. *Ciencia y Tecnología*. 2:15-20.
- Ezhilarasi PN, Karthik P, Chhanwal N, Anandharamakrishnan C. 2013. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review *Food Bioprocess Technol*. 6(3):628-647.
- Fadini AL, Rocha FS, Alvim ID, Sadahira MS, Queiroz MB, Alves RMV, Silva LB. 2013. Mechanical properties and water vapour permeability of hydrolysed collagen–cocoa butter edible films plasticised with sucrose. *Food Hydrocolloids* 30:625–631.
- Fakhouri FM, Martelli SM, Caon T, Velasco JI, Mei LHI. 2015. Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. *Postharvest Biol. Technol.* 109:57-64.
- Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol*. 6:121–131.
- Fonteles TV, Costa MG, deJesus ALT, Rodrigues S. 2011. Optimization of the fermentation of cantaloupe juice by *Lactobacillus casei* NRRLB-442. *Food Bioprocess Technol*. 5(7):2819–2826.
- Forbes JM. Environmental factors affecting feed intake. 1995. En: *Voluntary Intake and Diet Selection in Farm Animals*. Forbes JM. Wallingford, UK: CAB. p. 332–353.
- Frizzo LS, Soto LP, Bertozzi E, Zbrun MV, Signorini ML, Sequeira G, Rodriguez Armesto R, Rosmini MR. 2011. Intestinal populations of *Lactobacilli* and coliforms after in vivo *Salmonella dublin* challenge and their relationship with microbial translocation in calves supplemented with lactic acid bacteria and lactose. *Anim Feed Sci Technol*. 170: 12-20.
- Frizzo LS, Soto LP, Zbrun MV, Signorini ML, Bertozzi E, Sequeira JG, Rodriguez Armesto R, Rosmini MR. 2011. Effect of lactic acid bacteria and lactose on growth performance and intestinal microbial balance of artificially reared calves. *Livestock Sci*. 140: 246-252.
- Fusari ML, Blajman J, Nicola N, Soto LP, Sequeira G, Martí LE, Signorini ML, Frizzo LS. Evaluación del uso de medios a base de lactosuero para la obtención de biomasa de

- cepas probióticas de *Lactobacillus* spp. aisladas de ileon porcino. XIV Jornadas de Divulgación Técnico científicas en Ciencias Veterinarias. Casilda, 27 de Agosto 2013.
- Fusari ML, Martí LE, Sequeira GJ, Rosmini MR, Frizzo LS. Estudio molecular de la microbiota intestinal de lechones tratados con la cepa probiótica *Lactobacillus reuteri* DSPV 002C. XV Congreso Argentino de Microbiología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 25 al 27 de Septiembre 2019.
  - Fusari, M.L.; Zimmermann, J. A.; Romero Scharpen, A.; Astesana, D. M.; Rossler, E.; Bessone, F.; Alustiza, F.; Soto, L. P.; 2017. Prevención de diarreas y mejora en la performance productiva en cerdos mediante la administración de *Lactobacillus reuteri* 002 DSPVC. XVIII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas, Facultad de Ciencias Veterinarias. V Jornada Latinoamericana III Jornadas de Ciencia y Tecnología, Facultad de Ciencias Agrarias. II Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Rosario. Casilda y Zavalla, 12 y 13 de Septiembre.
  - Fusari ML, Zimmermann JA, Astesana DM, Olivero C, Lorenzón G, Bessone F, Alustiza F, Soto LP, Zbrun MV. Impact of *Lactobacillus reuteri* administration on swine growth by modulation of intestinal microbiota, V Simposio Internacional de Bacterias Lácticas (SIBAL). San Miguel de Tucumán, 19 al 21 de Octubre 2016.
  - Fusari ML, Zimmermann JA, Binci A, Romero Scharpen A, Berisivil A, Rossler E, Blajman J, Lorenzón G, Fuhr E, Astesana D, Signorini M, Zbrun M, Bessone F, Alustiza F, Frizzo L, Soto L. Propiedades in vivo del probiótico *Lactobacillus reuteri* DSPV 002C: colonización intestinal y modulación de la microbiota digestiva de cerdas durante la lactancia. XVII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. IV Jornada Latinoamericana II Jornadas de Ciencia y Tecnología. 2016.
  - Galeano JAC, Herrera AL, Suescún JP. 2016. The probiotic *Enterococcus faecium* modifies the intestinal morphometric parameters in weaning piglets. Rev Fac Nac Agron Medellin. 69(1):7803-7811.
  - Gallois M, Rothkotter HJ, Bailey M, Stokes CR, Oswald IP. 2009. Natural alternatives to in-feed antibiotics in pig production: can immunomodulators play a role? Animal. 3:1644-1661.
  - García del Moral, R. 1993. Laboratorio de Anatomía Patológica. Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana de España.
  - García MS, Garzón JP, López, GE, Galarza A. 2017. Efecto de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* sobre el desarrollo corporal y parámetros hematológicos en terneras Holstein criadas al pastoreo. Maskana. 8:5-8.



- Gardiner GE, Bouchier P, O' Sullivan E, Kelly J, Collins JK, Fitzgerald G, Ross RP, Stanton C. 2002. A spray-dried culture for probiotic cheddar cheese manufacture. *Int. Dairy J.* 12(9):749-756.
- Gaskins HR, Collier CT, Anderson DB. 2002. Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Anim. Biotechnol.* 13:29–42.
- Gaskins HR. 1997. Immunological aspects of host-microbiota interactions at the intestinal epithelium. En: Mackie RI, White BA, Isaacson RE. *Gastrointestinal microbiology vol. 2 gastrointestinal microbes and host interactions.* Chapman and Hall. New York. p 537-587.
- Gebru E, Lee JS, Son JC, Yang SY, Shin SA, Kim B, Kim MK, Park SC. 2010. Effect of probiotic-, bacteriophage-, or organic acid-supplemented feeds or fermented soybean meal on the growth performance, acute-phase response, and bacterial shedding of grower pigs challenged with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J. Anim. Sci.* 88:3880–3886.
- Giang H, Viet T, Ogle B. 2011. Effects of supplementation of probiotics on the performance, nutrient digestibility and faecal microflora in growing-finishing pigs. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 24:655–661.
- Gosiewski T, Brzywczy-Wloch M. 2015. The use of PFGE method in genotyping of selected bacteria species of the *Lactobacillus* genus. *Methods Mol. Biol.* 1301:225–240.
- Govender M, Choonara YE, Kumar P, du Toit LC, van Vuuren S, Pillay V. 2014. A review of the advancements in probiotic delivery: Conventional vs. non-conventional formulations for intestinal flora supplementation. *AAPS PharmSciTech*, 15(1):29–43.
- Guarner F, Requena T, Marcos A. 2010. Consensus statements from the Workshop “Probiotics and Health: Scientific evidence”. *Nutr Hosp.* 25: 700-4.
- Guerra NP, Bernárdez PF, Méndez J, Cachaldora P, Castro LP. 1997. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 134:89–107.
- Guo XH, Kim JM, Nam HM, Park SY, Kim JM. 2010. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe.* 16(4):321-326.
- Halloran K, Underwood MA. 2019. Probiotic mechanisms of action. *Early Hum Dev* 135:58–68.
- Haq IU, Akram F. 2017. Enhanced Production of a Recombinant Multidomain Thermostable GH9 Processive Endo-1,4-beta-Glucanase (CenC) from

- Ruminiclostridium thermocellum* in a Mesophilic Host Through Various Cultivation and Induction Strategies. *Appl Biochem Biotechnol.* 183(1):171-188.
- Hartemink R, Domenech VR, Rombout FM. 1997. LAMVAB—A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *J. Microbiol. Methods.* 29(2):77-84.
  - Hayakawa T, Masuda T, Kurosawa D, Tsukahara T. 2016. Dietary administration of probiotics to sows and/or their neonates improves the reproductive performance, incidence of post-weaning diarrhea and histopathological parameters in the intestine of weaned piglets. *Anim. Sci. J.* 87:1501–1510.
  - Heidebach T, Först P, Kulozik U. 2009. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocoll.* 23:1670-1677.
  - Heidebach T, Först P, Kulozik U. 2010. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *J. Food Eng.* 98(3):309-316.
  - Heidebach T, Först P, Kulozik U. 2012. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 52:291–311.
  - Hopwood DE, Hampson DJH. 2003. Interactions between the intestinal microflora, diet and diarrhoea, and their influences on piglet health in the immediate post-weaning period. En: J.R. Pluske, J. Le Dividich, M.W.A. Verstegen. Wageningen Academic Publishers. *Weaning the Pig — Concepts and Consequences.* Wageningen, Netherlands. p 199-218.
  - Hosseini SA, Meimandipour A, Alami F, Mahdavi A, Mohiti-Asli M, Lotfollahian H, Cross D. 2013. Effects of ground thyme and probiotic supplements in diets on broiler performance, blood biochemistry and immunological response to sheep red blood cells. *Ital J Anim Sci.* 12:e19
  - Hsiao HC, Lian WC, Chou CC. 2004. Effect of packaging conditions and temperature on viability of microencapsulated bifidobacteria during storage. *J. Sci. Food Agric.* 84:134-139.
  - Hur J, Choi YY, Park JH, Jeon BW, Lee HS, Kim AR, Lee JH. 2011. Antimicrobial resistance, virulence-associated genes, and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* isolated from piglets with diarrhea in Korea. *J. Vet. Res.* 75(1):49–56.
  - Huyghebaert G, Ducatelle R, Van Immerseel F. 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet J.* 187(2):182–188.

- Isaac LJ, Abah G, Akpan B, Ekaette IU. 2013. Haematological properties of different breeds and sexes of rabbits. Proc. of the 18th Annual Conf. of Anim. Sci. Assoc. of Nig. 24-27.
- Israeli-Ruimy V, Bule P, Jindou S, Dassa B, Moraïs S, Borovok I, Barak Y, Slutzki M, Hamberg Y, Cardoso V, Alves VD, Najmudin S, White BA, Flint HJ, Gilbert HJ, Lamed R, Fontes CMGA, Bayer EA. 2017. Complexity of the *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 cellulosome reflects an expansion of family-related protein-protein interactions. Sci Rep. 7:42355.
- Jacobsen C, Nielsen-Rosenfeldt, V, Hayford E, Moller PL, Michaelsen KF, Paerregaard, Sandström B, Tvede M, Jakobsen M. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. Appl Environ Microbiol. 65(11):4949-4956.
- Jafari M, Mortazavian AM, Hosseini H, Safaei F, Khaneghah AM, Sant'Ana AS. 2017. Probiotic Bacillus: Fate during sausage processing and storage and influence of different culturing conditions on recovery of their spores. Int. Food Res. J. 95:46–51.
- Jeong J, Kim J, Lee S, Kim I. 2015. Evaluation of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus* probiotic supplementation on reproductive performance and noxious gas emission in sows. Ann. Anim. Sci. 15:699–710.
- Jiang Z Y, Wei S Y, Wang Z L, Zhu C, Hu S L, Zheng C T, Chen Z, Hu Y J, Wang L, Ma X Y, Yang X F. 2015. Effects of different forms of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, intestinal development, and systemic immunity in early-weaned piglets. J Anim Sci Biotechnol. 6:47
- Jimenez E, Sanchez B, Farina A, Margolles A, Rodriguez JM. 2014. Characterization of the bile and gall bladder microbiota of healthy pigs. Microbiologyopen. 3:937-949.
- Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. 2000. Digestive and bacterial enzyme activities in broiler fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. Poult. Sci. 79:866–891.
- Jørgensen J. Versatility of probiotics in swine production. Pig Focus Asia. 3 al 5 de marzo 2014. Bangkok, Tailandia.
- Kabir SML. The role of probiotics in the poultry industry. 2009. Int J Mol Sci. 10(8):3531–46.
- Kader AA. 1986. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruit and vegetables. Food Technology. 40:99–104.

- Kahar AA. 2016. The Effect of Different Freeze Dried Formulations on The Viability of Lactic Acid Bacteria In Lactose-Free Yogurt Production. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 10:164-171.
- Kailasapathy K. 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. Curr Issues Intest Microbiol. 3(2):39-48.
- Kailasapathy K. 2009. Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 4(33): 1-19.
- Kalavethy R, Abdullah N, Jalaludin S, Ho YW. 2003. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. Br. Poult. Sci. 44:139–144.
- Kaneko J, Cornelius C. 1971. Clinical biochemistry of domestic animals. En: Vol I. Academia Press. New York, USA. p 439.
- Katouli M, Lund A, Wallgren P, Kuhn I, Soderlind O, Mollby R. 1997. Metabolic fingerprinting and fermentative capacity of the intestinal flora of pigs during pre- and post-weaning periods. J Appl Microbiol. 83:147–154.
- Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, Fakiri EM. 2013. Health benefits of probiotics: a review. ISRN nutrition. ID:481651.
- Khan TA, Zafar F. 2005. Haematological study in response to various doses of estrogen in broiler production. Int. J. Poult. Sci. 40(10):748-751.
- Kim HB, Borewicz K, White BA, Singer RS, Sreevatsan S, Isaacson RE. 2011. Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. Vet Microbiol. 153(1-2):124–133.
- Kjeldsen N. 2002. Producing pork without antibiotic growth promoters: The Danish experience. Adv. Pork Prod. 13:107-115.
- Klaenhammer TR. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie. 70:337–349.
- Knudsen H. 2000. Los Probioticos: Pardo Suizo Marketing. Associao brasileira de Criadores de Ganado Pardo Suizo.
- Konstantinov SR, Awati A, Williams BA, Miller BG, Jones P, Stokes CR. 2006. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. Environmental Microbiology. 8:1191- 1199.
- Konstantinov SR, Smidt H, Akkermans ADL, Casini L, Trevisi P, De Filippi S, Bosi P, De Vos WM. 2008. Feeding of *Lactobacillus sobrius* reduces *Escherichia coli* F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets. FEMS Microbiol. Ecol. 66:599–607.

- Korbekandi H, Mortazavian AM, Iravani S. 2011. Technology and stability of probiotic in fermented milks. En: Shah N, Cruz AG, Faria JAF. Probiotic and prebiotic foods: Technology, stability and benefits to the human health. NewYork: Nova Science Publishers. pp. 131–169.
- Kos B, Suskovic J, Beganovic J, Gjuracic K, Frece J, Iannaccone C. 2008. Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. World J Microbiol Biotechnol. 24(5):699–707.
- Kothari D, Patel S, Kim SK. 2019. Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: a review. Biomed Pharmacother. 111: 537-547.
- Kraatz M, Wallace RJ, Svensson L. 2011. *Olsenella umbonata* sp. nov., a microaerotolerant anaerobic lactic acid bacterium from the sheep rumen and pig jejunum, and emended descriptions of *Olsenella*, *Olsenella uli* and *Olsenella profusa*. Int J Syst Evol Microbiol. 61:795–803.
- Kramer B Thielman, J. 2016. Monitoring the live to dead transition of bacteria during thermal stress by a multi-method approach. J. Microbiol. Methods. 123:24–30.
- Kreuzer S, Rieger J, Strucken EM, Thaben N, Hünigen H, Nöckler K, Janczyk P, Plendl J, Brockmann GA. 2014. Characterization of CD4+ subpopulations and CD25+ cells in ileal lymphatic tissue of weaned piglets infected with *Salmonella typhimurium* with or without *Enterococcus faecium* feeding. Veterinary Immunol. Immunopathol. 158:143–155.
- Kritas SK, Marubashi T, Filioussis G, Petridou E, Christodouloupoulos G, Burriel AR, Tzivara A, Theodoridis A, Pískoriková M. 2015. Reproductive performance of sows was improved by administration of a spring bacillary probiotic (C-3102). J. Anim. Sci. 93:405.
- Kulagina EV, Efimov BA, Maximov PY, Kafarskaia LI, Chaplin AV, Shkoporov AN. 2012. Species composition of *Bacteroidales* order bacteria in the feces of healthy people of various ages. Biosci Biotechnol Biochem. 76:169–171.
- Kumar M, Nagpal R, Kumar R, Hemalatha R, Verma V, Kumar A et al. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. Exp Diabetes Res. 902917.
- Lakkis JM. Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems. Blackwell Publishing. Oxford, UK. 2007

- Langa S, Landete JM, Martín-Cabrejas I, Rodríguez E, Arqués JL, Medina M. 2013. In situ reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products. Food Control. 33:200–206.
- Lázaro C, Carcelén F, Torres M, Ara M. 2005. Efecto de probióticos en el alimento de marranas sobre los parámetros productivos de lechones. G. Rev Inv Vet Perú. 16(2):97-102.
- Le Dividich J, Rooke, JA, Herpin P. 2005. Review: nutritional and immunological importance of colostrum for the newborn pig. J. Agric. Sci. 143:469–485.
- Le Dividich J, Seve B. 2000. Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism and hormonal adjustments in the piglet. Domest. Anim. Endocrinol. 19:63-74.
- Lee SH, Ingale SL, Kim JS, Kim KH, Lokhande A, Kim EK, Kwon IK, Kim YH, Chae BJ. 2014. Effects of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* LS 1–2 fermentation biomass on growth performance, nutrient digestibility, cecal microbiota and intestinal morphology of weanling pig. Anim. Feed Sci Technol. 188:102–110
- Lee YK, Salminen S. 2009. Handbook of probiotics and prebiotics. 2nd ed. Hoboken, NJ: JohnWiley and Sons, Inc.
- Letellier A, Messier S, Lessard L, Quessy S. 2000. Assessment of various treatments to reduce carriage of *Salmonella* in swine. CAN J VET RES. 64(1):27–31.
- Levast B, Berri M, Wilson HL, Meurens F, Salmon H. 2014. Development of gut immunoglobulin A production in piglet in response to innate and environmental factors. Dev Comp Immunol. 44(1)235-244.
- Li H, Thuy Ho VT, Turner MS, Dhital Lwt S. 2016. Encapsulation of *Lactobacillus plantarum* in porous maize starch. Food Sci. Technol. 74:542-549.
- Li J, Ahn J, Liu D, Chen S, Ye X, Ding T. 2016. Evaluation of ultrasound induced damage to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by flow cytometry and transmission electron microscopy. Appl. Environ. Microbiol. 82:1828–1837.
- Li M, Gong J, Cottrill M, Yu H, de Lange C, Burton J, Topp E. 2003. Evaluation of QIAamp® DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. J. Microbiol. Methods. 54:13–20.
- Li XY, Chen XG, Sun ZW, Park HJ, Cha D-S. 2011. Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. Carbohydr Polym 83(4): 1479-1485.

- Li Y, Hou S, Chen J, Peng W, Wen W, Chen F, Huang X. 2019. Oral administration of *Lactobacillus delbrueckii* during the suckling period improves intestinal integrity after weaning in piglets. *J. Funct. Foods.* 63:103591.
- Lian W, Hsiao H, Chou C. 2003. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *Int. J. Food Microbiol.* 86:293-301.
- Liao SF, Nyachoti M. 2017. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Anim Nutr.* 3(4):331–43.
- Liu H, Cui SW, Chen M, Li Y, Liang R, Xu F, Zhong F. 2017. Protective approaches and mechanisms of microencapsulation to the survival of probiotic bacteria during processing, storage and gastrointestinal digestion: A review. 59(17):2863-2878
- Liu H, Ji HF, Zhang DY, Wang SX, Wang J, Shan DC, Wang YM. 2015. Effects of *Lactobacillus brevis* preparation on growth performance fecal microflora and serum profile in weaned pigs. *Livest. Sci.* 178:251–254.
- Liu H, Zhang J, Zhang S, Yang F, Thacker PA, Zhang G, Qiao S, Ma X. 2014. Oral administration of *Lactobacillus fermentum* I5007 favors intestinal development and alters the intestinal microbiota in formula-fed piglets. *J Agric Food Chem.* 62:860-866.
- Loh TC, Choo PY, Cheong YH. 2002. Effects of organic acid and natural herbs on performance and incidence of diarrhoea in post weaning pigs. *Mal. J. Anim. Sci.* 7 (2):25–30.
- Londoño-Pérez S, Parra J. 2015. Effect Of The Addition Of Probiotic Strains On Blood Metabolites In Growing Pigs. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial.* 13(2):49-56.
- Looft T, Allen HK, Cantarel BL, Levine UY, Bayles DP, Alt DP, Henrissat B, Stanton TB. 2014. Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *ISME J.* 8:1566-1576.
- Looft T, Levine UY, Stanton TB. 2013. *Cloacibacillus porcorum* sp. nov., a mucin-degrading bacterium from the swine intestinal tract and emended description of the genus *Cloacibacillus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* 63(6):1960–1966.
- López de Lacey AM, López-Caballero ME, Gómez-Estaca J, Gómez-Guillén MC, Montero P. 2012. Functionality of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* incorporated to edible coatings and films. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 16:277-282.

- Lye HS, Kuan CY, Ewe JA, Fung WY, Liong MT. 2009. The Improvement of Hypertension by Probiotics: Effects on Cholesterol, Diabetes, Renin, and Phytoestrogens. *Int J Mol Sci.* 10(9):3755-3775.
- Mach N, Berri M, Estellé J, Levenez F, Lemonnier G, Denis C, Leplat JJ, Chevaleyre C, Billon Y, Doré J, Rogel-Gaillard C, Lepage P. 2015. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environ. Microbiol. Rep.* 7(3):554–569.
- MAGYP Ministerio de agricultura, ganadería y pesca. Anuario 2018. Disponible en: [https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/porcinos/estadistica/\\_archivos//000005-Anuario/180000-Anuario%202018.pdf](https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/porcinos/estadistica/_archivos//000005-Anuario/180000-Anuario%202018.pdf)
- Mair C, Pnitzner C, Pfaffl MW, Schedle K, Meyer HH, Windisch W. 2010. Inulin and probiotics in newly weaned piglets: effects on intestinal morphology, mRNA expression levels of inflammatory marker genes and haematology. *Arch Anim Nutr.* 64(4):304-321.
- Majzoobi M, Kaveh Z, Blanchard CL, Farahnaky A. 2015. Physical properties of pregelatinized and granular cold water swelling maize starches in presence of acetic acid. *Food Hydrocoll.* 51:375-382.
- Mann E, Dzieciol M, Metzler-Zebeli BU, Wagner M, Schmitz-Esser S. 2014. Microbiomes of unreactive and pathologically altered ileocaecal lymph nodes of slaughter pigs. *Appl Environ Microbiol.* 80(1):193-203.
- Marín A, García A, Marisol Gutiérrez M, Mabel González M, Ochieng O. 2012. Efecto probiótico del BIOPRANAL sobre los indicadores bioproductivos y de salud en terneros. 1(2):33-41.
- Martelli, SM, Laurindo, JB. 2012. Chicken feather keratin films plasticized with polyethylene glycol. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 61:17–29.
- Martín MJ, Lara-Villoslada F, Ruiz MA, Morales ME. 2015. Microencapsulation of bacteria: a review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 27:15-25.
- McCracken KJ, Kelly D. 1984. Effect of diet and post-weaning food intake on digestive development of early-weaned pigs. *Proc Nutr Soc.* 43:110A.
- Meng Q, Yan L, Ao X, Zhou T, Wang J, Lee J, Kim I. 2010. Influence of probiotics in different energy and nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, and blood characteristics in growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 88:3320–3326.



- Meremäe K, Roasto M, Tamme T, Ivanova M. 2010. In vitro study of the antimicrobial effect of selected probiotics combined with prebiotics on campylobacter jejuni Arch. Lebensmittelhyg. 61(4):132-138.
- Messaoudi S, Kergourlay G, Rossero A, Ferchichi M, Prévost H, Drider D, Manai M, Dousset X. 2011. Identification of lactobacilli residing in chicken ceca with antagonism against Campylobacter. Int. Microbiol. 14:103-110.
- Metzler BU, Mosenthin R. 2008. A Review of Interactions between Dietary Fiber and the Gastrointestinal Microbiota and Their Consequences on Intestinal Phosphorus Metabolism in Growing Pigs. Asian-Australas J Anim Sci. 21(4):603-61.
- Mikkelsen LL, Bendixen C, Jakobsen M, Jensen BB. 2003. Enumeration of bifidobacteria in gastrointestinal samples from piglets. Appl. Environ. Microbiol. 69:654–658.
- Min Y, Choi Y, Choe J, Kim Y, Jeong Y, Kim D, Kim J, Jung H, Song, M. 2019. Effects of dietary mixture of protease and probiotics on growth performance, blood constituents, and carcass characteristics of growing-finishing pigs. J Anim Sci Technol, 61(5):272–277.
- Min Y, Choi Y, Kim Y, Jeong Y, Kim D, Kim J, Jung H, Song M. 2019. Effects of protease supplementation on growth performance, blood constituents, and carcass characteristics of growing-finishing pigs. J Anim Sci Technol. 61(4):234-238.
- Ming LC, Rahim RA, Wan HY, Ariff AB. 2009. Formulation of protective agents for improvement of Lactobacillus salivarius I 24 survival rate subjected to freeze drying for production of live cells in powderized form. Food Bioprocess Tech. 2:431-441.
- Miranda JE, Marín A, Marrero LI, García Y, García-Díaz JR. 2019. Evaluation of hemochemical changes in the blood of piglets supplemented with two microbial preparations.
- Moeser AJ, Klok CV, Ryan, KA, Wooten JG, Little D, Cook VL, Blikslager, AT. 2007. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 292: 173–181.
- Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. 2006. Preservation of micro-organisms by drying; A review. Journal of Microbiological Methods. 66(2):183-193.
- Muñoz R, Tor M, Estany J. 2012. Relationship between blood lipid indicators and fat content and composition in Duroc pigs. Livest. Sci. 148:95–102.
- Muthukumarasamy P, Allan-Wojtas P, Holley RA. 2006. Stability of Lactobacillus reuteri in different types of microcapsules. J Food Sci 71:20-24.

- Naqid IA, Owen JP, Maddison BC, Gardner DS, Foster N, Tchórzewska MA, La Ragione RM, Gough KC. 2015. Prebiotic and probiotic agents enhance antibody based immune responses to Salmonella Typhimurium infection in pigs. Anim. Feed Sci. Tech. 201:57–65.
- Nazef L, Belguesmia Y, Tani A, Prévost H, Drider D. 2008. Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: evidence on anti-*Campylobacter* and anti-*Listeria* activities. Poult. Sci. 87:329.
- Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Sada A, Orlando P. 2009. Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated Lactobacillus acidophilus and survival under simulated gastrointestinal conditions. J Funct Foods 1:319-323.
- Nemcova R. 1997. Criteria for selection of *lactobacilli* for probiotic use. VetMed (Praha). 42:19–27.
- Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC. 2009. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. Inflamm Bowel Dis 15(2):300–310.
- Nhung NT, Cuong NV, Thwaites G, Carrique-Mas J. 2016. Antimicrobial usage and antimicrobial resistance in animal production In southeast Asia: A review. Antibiotics. 5:37.
- Nishiyama K, Seto Y, Yoshioka K, Kakuda T, Takai S, Yamamoto Y, Mukai T. 2014. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 reduces infection by and colonization of *Campylobacter jejuni*. PloS One. 9:e108827.
- Nowak P, Kasprowicz-Potocka M, Zaworska A, Nowak W, Stefańska B, Sip A, Grajek W, Grajek K, Frankiewicz A. 2019. The effect of combined feed additives on growing pigs' performance and digestive tract parameters. Ann. Anim. Sci. 19(3):807-819.
- Olmos-Hernandez A, Trujillo-Ortega ME, AlonsoSpilsbury M, Becerril-Herrera M, Hernandez-Gonzalez R, Mota-Rojas D. 2010. Porcine recombinant somatotropin administered to piglets during the first week of life: effects on metabolic and somatometric variables. Arch Med Vet. 42:93–99.
- Ooi LG, Liong MT. 2010. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: A review of in vivo and in vitro findings. Int. J. Mol. Sci. 11:2499-2522.
- Pajarillo EAB, Chae JP, Balolong MP, Kim HB, Park CS, Kang DK. 2015. Effects of probiotic Enterococcus faecium NCIMB 11181 administration on swine faecal microbiota diversity and composition using barcoded pyrosequencing. Anim Feed Sci Tech 201:80–88.

- Papatsiros VG, Tassis PD, Tzika ED, Papaioannou DS, Petridou E, Alexopoulos C, Kyriakis SC. 2011. Effect of benzoic acid and combination of benzoic acid with probiotic containing *Bacillus cereus* var. *toyoi* in weaned pig nutrition. *J Vet Sci.* 14(1):117–25.
- Parvaneh K, Jamaluddin R, Karimi G, Erfani R. 2014. Effect of probiotics supplementation on bone mineral content and bone mass density. *TSWJ.* 14:1-6.
- Patil AK, Kumar S, Verma AK, Baghel RPS. 2015. Probiotics as feed additives in weaned pigs: a review. *Livest. Res. Int.* 3:31-39.
- Patiño F, Herrera V, López D, Parra J. 2019. Blood metabolites and zootechnical parameters in piglets weaned at two ages and with the addition of antimicrobials. *Rev Inv Vet Perú.* 30(2):612-623.
- Pedroso DL, Thomazini M, Barrozo Heinemann RJ, Favaro-Trindade CS. 2012. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. *Int Dairy J.* 26:127-132.
- Pereira ALF, Maciel TC, Rodrigues S. 2011. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Res. Int.* 44:1276–1283.
- Perri AM, O'Sullivan TL, Harding JCS, Wood RD, Friendship RM. 2017. Hematology and biochemistry reference intervals for Ontario commercial nursing pigs close to the time of weaning. *Can Vet J.* 58:371–6.
- Phillips GO, Takigami S, Takigami M. 1996. Hydration characteristics of the gum exudate from *Acacia Senegal* Food Hydrocoll. 10:11-19.
- Pieper R, Janczyk P, Urubschurov V, Hou Z, Korn U, Pieper B, Souffrant WB. 2010. Effect of *Lactobacillus plantarum* on intestinal microbial community composition and response to enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge in weaning piglets. *Livest. Sci.* 133(1–3):98-100.
- Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. 2019. Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition.* 10:49–66.
- Pluske JR, Pethick DW, Hopwood DE, Hampson DJ. 2002. Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pigs. *Nutr Res Rev.* 15:333–371.
- Pluske JR, Williams IH, Aherne FX. 1996. Maintenance of villous height and crypt depth in piglets by providing continuous nutrition after weaning. *AnimSci.* 62:131-144.
- Poroyko V, White JR, Wang M, Donovan S, Alverdy J, Liu DC, Morowitz MJ. 2010. Gut Microbial Gene Expression in Mother-Fed and Formula-Fed Piglets. *PLOS ONE.* 5(8):e12459.

- Prieto ML, O'Sullivan L, Tan SP, McLoughlin P, Hughes H. 2014. Evaluation of the Efficacy and Safety of a Marine-Derived Bacillus Strain for Use as an In-Feed Probiotic for Newly Weaned Pigs. Plos One 9(2):e88599.
- Priyodip P, Prakash PY, Balaji S. 2017. Phytases of Probiotic Bacteria: Characteristics and Beneficial Aspects. Indian J. Microbiol. 57(2):148-154.
- Randall RC, Phillips GO, Williams PA. 1989. Fractionation and characterization of gum from *Acacia Senegal*. Food Hydrocoll. 3:65-75.
- Rauw WM, Portolés O, Corella D, Soler J, Reixach J, Tibau J, Prat JM, Diaz I, Gómez-Raya L. 2007. Behaviour influences cholesterol plasma levels in a pig model. Animal. 1(6):865–871.
- Ray S, Raychaudhuri U, Chakraborty R. 2016. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology Food Bioscience. 13:76-83.
- Reid G. 2016. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 30(1):17-25.
- Revidatti MA, Delgado JV, Capellari A, Prieto PN. 2005. Estudio morfoestructural preliminar de una población porcina en la provincia de Corrientes (Argentina). Archivos de Zootecnia. 54:227-232.
- Rodrigues MAM, Oliveira DA, Taketomi EA, Hernandez-Blazquez FJ. 2007. IgA production, coliforms analysis and intestinal mucosa morphology of piglets that received probiotics with viable or inactivated cells. Pesqui. Vet. Bras. 27(6):241–245.
- Rodríguez-Barona S, Giraldo GI, Montes LM. 2016. Encapsulación de Alimentos Probióticos mediante Liofilización en Presencia de Prebióticos. Información tecnológica, 27(6):135-144.
- Rodriguez-Huezo ME, Duran-Lugo R, Prado-Barragan LA, Cruz-Sosa F, Lobato-Calleros C, Alvarez-Ramirez J, Vernon-Carter EJ. 2007. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of Bifidobacterium bifidum following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. Int. Food Res. J. 40:1299–1306.
- Rondón AJ, Ojito Y, Arteaga FG, Laurencio M, Milián G, Pérez Y. 2013. Efecto probiótico de *Lactobacillus salivarius* C 65 en indicadores productivos y de salud de cerdos lactantes. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 47(4):401-407.
- Roselli M, Pieper R, Rogel-Gaillard C, de Vries H, Bailey M, Smidt H, Lauridsen C. 2017. Immunomodulating effects of probiotics for microbiota modulation, gut health and disease resistance in pigs. Anim Feed Sci Technol. 233:104–119.

- Rosmini M, Sequeira G, Guerrero-Legarreta I, Martí L, Dalla Santina R, Frizzo L, Bonazza JC. 2004. Producción de Probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Rev. Mex. Ing. Qca.* 3:181-191.
- Ross RP, Desmond C, Fitzgerald GF, Stanton C. 2005. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *J. Appl. Microbiol.* 98:1410-1417.
- Rürger M, Ackermann M, Reichl U. 2014. Species-specific viability analysis of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Staphylococcus aureus* in mixed culture by flow cytometry. *BMC Microbiology.* 14: 56.
- Rulikowska A, Kilcawley KN, Doolan IA, Alonso-Gomez M, Nongonierma AB, Hannon JA, Wilkinson MG. 2013. The impact of reduced sodium chloride content on Cheddar cheese quality. *Int. Dairy J.* 28, 45–55.
- Samedi L, Charles LA. 2019. Viability of 4 Probiotic Bacteria Microencapsulated with Arrowroot Starch in the Simulated Gastrointestinal Tract (GIT) and Yoghurt. *Foods.* 8:175.
- Sanders ME, Huisin't Veld JHJ. 1999. Bringing a probiotic containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Leeuwenhoek* 76:293–315.
- Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. 2007. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnol. Prog.* 23:302-315.
- Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. 2008. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes *J. Appl. Microbiol.* 105(1)1-13.
- Sanz Y. 2007. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains. *Int Dairy J.* 17:1284–1289.
- Scharek-Tedin L, Kreuzer-Redmer S, Twardziok SO, Siepert B, Klopfleisch R, Tedin K, Zentek J, Pieper R. 2015. Probiotic treatment decreases the number of CD14-expressing cells in porcine milk which correlates with several intestinal immune parameters in the piglets. *Front. Immunol.* 6:108.
- Semiadi G, Nugraha RTP. 2009. Some Notes on Biological Aspects of Captive Javan Warty Pig (*Sus verrucosus*). *Biodiversitas.* 10(3):124-128.
- Serna-Cock L, Vallejo-Castillo V. 2013. Probiotic encapsulation. *Afr J Microbiol Res* 7(40):4743–4753.
- Sharma-Kuinkel BK, Rude TH, Fowler VG. 2016. Pulse field gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* 1373:117–130.

- Shu B, Yu W, Zhao Y, Liu X. 2006. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying J. Food Eng. 76:664-669.
- Signorini ML, Soto LP, Zbrun MV, Sequeira JG, Rosmini MR, Frizzo LS. 2012. Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. Res Vet Sci. 93:250-258.
- Simpson JM, McCracken VJ, Gaskins HR, Mackie RI. 2000. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. Appl. Environ. Microbiol. 66:4705–4714.
- Soto LP, Frizzo LS, Avataneo E, Zbrun MV, Bertozzia E, Sequeira G, Signorini ML, Rosmini MR. 2011. Design of macrocapsules to improve bacterial viability and supplementation with a probiotic for young calves. Anim Feed Sci Technol. 165: 176-183.
- Soto LP, Zbrun MV, Frizzo LS, Signorini ML, Sequeira GJ, Rosmini MR. 2014. Effects of bacterial inoculants in milk on the performance of intensively reared calves. Anim. Feed Sci. Technol. 189:117–122.
- Speiser S, Scharek-Tedin L, Mader A, Saalmüller A, Gerner W, Männer K, Stadler J, Zentek J. 2015. Immune response of piglets on a PRRSVvaccination-altered by different feed additives?. Livest. Sci. 174:96–104.
- Starke IC, Pieper R, Neumann K, Zentek J, Vahjen W. 2013. Individual responses of mother sows to a probiotic *Enterococcus faecium* strain lead to different microbiota composition in their offspring. Benef. Microbes. 4(4):345-356.
- Starzyński RR, Laarakkers, CMM, Tjalsma H, Swinkels DW, Pieszka M, Stys A. 2013. Iron supplementation in suckling piglets: how to correct iron deficiency anemia without affecting plasma hepcidin levels. PLoS ONE 8:e64022.
- Su LC, Lin CW, Chen Mj. 2007. Development of an oriental-style dairy product coagulated by microcapsules containing probiotics and filtrates from fermented rice. Int. J. Dairy Technol. 60:49-54.
- Suda Y, Villena J, Takahash Y, Hosoya S, Tomosada Y, Tsukida K, Shimazu T, Aso H, Tohno M, Ishida M, Makino S, Ikegami S, Kitazawa H. 2014. Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* as immune-health promoting factor to improve growth performance and productivity in post-weaning pigs. BMC Immunol. 15:24.
- Suo C, Yin Y, Wang X, Lou X, Song D, Wang X, Gu Q. 2012. Effects of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 on pig growth and pork quality. BMC Vet Res. 8:89-97.

- Tactacan GB, Cho SY, Cho JH, Kim IH. 2016. Performance responses, nutrient digestibility, blood characteristics, and measures of gastrointestinal health in weanling pigs fed protease enzyme. *Asian-Australas J Anim Sci.* 29:998-1003.
- Taranto MP, Sesma F, Valdez GF. 1999. Localization and primary characterization of bile salt hydrolase from *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnol. Lett.* 21:935-938.
- Taras D, Vahjen W, Macha M, Simon O. 2005. Response of performance characteristics and fecal consistency to long-lasting supplementation with the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* to sows and piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 59:405-417.
- Tareb R, Bernardeau M, Horvath P, Vernoux JP. 2015. Rough and smooth morphotypes isolated from *Lactobacillus farciminis* CNCM I-3699 are two closely-related variants. *Int J Food Microbiol.* 193:82–90.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233-2239.
- Thacker PA. 2013. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. *J Anim Sci Biotechnol.* 4:35.
- Thompson CL, Wang B, Holmes AJ. 2008. The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. *ISMEJ.* 2:739–748.
- Timmerman HM, Mulder L, Everts H, Van Espen DC, Van Der Wal E, Klaassen G, Rouwers SMG, Hartemink R, Rombouts FM, Beynen AC. 2005. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *J. Dairy Sci.* 88:2154–2165.
- Togun VA, Oseni BSA, Ogundipe JA, Arewa TR, Hameed AA, Ajonijebu DC, Oyeniran A, Nwosisi I, Mustapha F. 2007. Effects of chronic lead administration on the haematological parameters of rabbit – a preliminary study. *Proc. of the 41st Conf. of the Agric. Soc. of Nig.* 341.
- Togun VA, Oseni BSA. 2005. Effect of low level inclusion of biscuit dust in broiler finisher diet apparently healthy red Sokoto goats. *Proc. of the 27th Ann. Conf. of Nig. Soc. for Anim. Prod.* 50-53.
- Trckova M, Faldyna M, Alexa P, Sramkova Zajacova Z, Gopfert E, Kumprechtova D, Auclair E, D'Inca R. 2014. The effects of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* on postweaning diarrhea, immune response, and growth performance in weaned piglets. *Anim. Sci. J.* 92:767–774.

- Trindade ML, Martins VD, Rodrigues NM, Souza ELS, Martins FS, Costa GMS. 2018. Oral administration of Simbioflora(R) (synbiotic) attenuates intestinal damage in a mouse model of 5-fluorouracil-induced mucositis. *Benefic. Microbes*. 9(3):477–486.
- Tripathi MK, Giri SK. 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J Funct Foods*. 9:225–241.
- Turker N, Hamamci H. 1998. Storage behaviour of immobilized dried microorganisms. *Food Microbiol*. 15: 3-11.
- Ubeda C, Bucci V, Caballero S, Djukovic A, Toussaint NC, Equinda M, Lipuma L, Ling L, Gobourne A, No D, Taur Y, Jenq RR, van den Brink MR, Xavier JB, Pamer EG. 2013. Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infect Immun*. 81(3):965–973.
- United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, World Agricultural Outlook Board/USDA. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. 10 de Octubre, 2019. Disponible en: <https://usda.library.cornell.edu/concern/publications/73666448x?locale=en>
- United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, World Agricultural Outlook Board/USDA. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. 10 de Abril, 2018. Disponible en: <https://usda.library.cornell.edu/concern/publications/73666448x?locale=en>
- Upadhaya, SD, Shanmugam, SK, Kang, DK and Kim, IH. 2017. Preliminary assessment on potentials of probiotic *B. subtilis* RX7 and *B. methylotrophicus* C14 strains as an immune modulator in Salmonella-challenged weaned pigs. *Trop. Anim. Health Pro*. 49:1065–1070.
- Ushanov L. 2018. Reduction of *C. jejuni* may require complex approach Author links open overlay panel. *Annals of agrarian science*. 16(4): 422-426
- Valeriano VD, Balolong MP, Kang DK. 2017. Probiotic roles of *Lactobacillus* spp. in swine: insights from gut microbiota. *J. Appl. Microbiol*. 122:554–567.
- Valerio F, Lonigro SL, Giribaldi M, Di Biase M, De Bellis P, Cavallarin L, Lavermicocca P. 2015. Probiotic *Lactobacillus paracasei* IMPC 2.1 strain delivered by ready-to-eat swordfish fillets colonizes the human gut after alternate-day supplementation. *J. Funct. Foods*. 17:468-475.
- Van der Fels-Klerx HJ, Puister-Jansen LF, Van Asselt ED, Burgers SL. 2011. Farm factors associated with the use of antibiotics in pig production. *J Anim Sci*. 89:1922–1929.



- van der Peet-Schwering C M, Jansman A J, Smidt H, Yoon I. 2007. Effects of yeast culture on performance, gut integrity, and blood cell composition of weanling pigs. *Anim. Sci. J.* 85:3099–3109.
- Vanderhoof JA. 2000. Probiotics and intestinal inflammatory disorders in infants and children. *J Pediatr Gastr Nutr*, 30:34-38.
- Veizaj-Delia E, Pirushi R. 2012. The utilization of probiotics as a way to improve human and animal gut health. *Maced J Anim Sci.* 2(2):175–181.
- Veizaj-Delia E, Piu T, Lekaj P, Tafaj M. 2010. Using combined probiotic to improve growth performance of weaned piglets on extensive farm conditions. *Livest. Sci.* 134(1–3):249–251.
- Vera R, Arosemena E, Calvo A, Marcelo J, Calvo M. 2015. Improved growth and use of maltodextrin as a cryoprotection and preservation in *Lactobacillus plantarum* CECT 8150 strain submitted to freeze-drying process. *Biomicroworld VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology*, At Barcelona, España. 2015.
- Versteegen MWA, Williams BA. 2002. Alternatives to the use of antibiotics as growth promoters for monogastric animals. *Anim. Biotechnol.*13:113–127.
- Vesterlund S, Salminen K, Salminen S. 2012. Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: a case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. *Int J Food Microbiol.* 157(2):319–21.
- Vincenzetti S, Savini M, Cecchini C, Micozzi D, Carpi F, Vita A, Polidori P. 2011. Effects of Lyophilization and Use of Probiotics on Donkey's Milk Nutritional Characteristics. *Int J Food Eng.* 7(5):1-16.
- Vinderola CG, Prosello W, Ghiberto D, Reinheimer JA. 2000. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non-probiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *J Dairy. Sci* 83:1905.
- Vohra A, Syal P, Madan A. 2016. Probiotic yeasts in livestock sector. *Animal Feed Science and Technology* 219:31–47.
- Wang J, Ji H, Zhang D, Liu H, Wang S, Shan D, Wang Y. 2011. Assessment of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* ZLP001 isolated from gastrointestinal tract of weaning pigs. *Afr J Biotechnol* 10:11303–11308.
- Wang J, Ji HF, Hou CL, Wang SX, Zhang DY, Liu H, Yan DC, Wang YM. 2014. Effects of *Lactobacillus johnsonii* XS4 supplementation on reproductive performance gut

- environment and blood biochemical and immunological index in lactating sows. *Livest. Sci.* 164:96–101.
- Wang J, Yin F, Zhu C, Yu H, Niven S, de Lange C, Gong J. 2012. Evaluation of probiotic bacteria for their effects on the growth performance and intestinal microbiota of newly-weaned pigs fed fermented high-moisture maize. *Livest. Sci.* 145:79-86.
  - Wang L, Yu X, Xu H, Aguilar ZP, Wei H. 2016. Effect of skim milk coated inulin-alginate encapsulation beads on viability and gene expression of *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying. *Food Science and Technology.* 68:8-13.
  - Wang XQ, Yang F, Liu C, Zhou HJ, Wu GY, Qiao SY, Wang J. 2012. Dietary supplementation with probiotic *Lactobacillus fermentum* I5007 and the antibiotic, aureomycin, differentially affects the small intestinal proteomes of weanling piglets. *J Nutr.* 142(1):7-13.
  - Wang YC, Yu RC, Chou CC. 2004. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *Int. J. Food Microbiol.* 93:209–217.
  - Weinbreck F, Bodnár I, Marco ML. 2010. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *Int J Food Microbiol.* 136: 364-367.
  - Whittemore CT, Green DM. 2006. Growth of the young weaned pig. En: *The Weaner Pig*. Varley MA, Wiseman J. Wallingford, UK: CAB. p. 1–15.
  - Wilkinson MG. 2018. Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: A review. *Trends Food Sci. Tech.* 78:1-10.
  - Willing BP, Malik G, van Kessel AG. 2012. Nutrition and gut health in swine. En: *Sustainable swine nutrition*. Chiba LI, editor. Chichester, UK: John Wiley & Sons. p. 197:213
  - Woods A, Ellis CR. 1994. *Laboratory Histopathology. A Complete Reference*. Longman Group Limited. Londres.
  - Xiao Z, Liu W, Zhu G, Zhou R, Niu Y. 2014. A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. *J. Sci. Food Agric.* 94:1482-1494.
  - Xing Y, Xu Q, Ma Y, Che Z, Cai Y, Jiang L. 2014. Effect of porous starch concentrations on the microbiological characteristics of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. *Food Funct.* 5(5):972-983.
  - Yan L, Kim IH. 2013. Effect of probiotics supplementation in diets with different nutrient densities on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, faecal

- microbial population and faecal noxious gas content in growing pigs. *J. Appl. Anim. Res.* 41(1):23-28.
- Yanachkina P, McCarthy C, Guinee T, Wilkinson M. 2016. Effect of varying the salt and fat content in Cheddar cheese on aspects of the performance of a commercial starter culture preparation during ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 224:7–15.
  - Yang GY, Zhu YH, Zhang W, Zhou D, Zhai CC, Wang JF. 2016. Influence of orally fed a select mixture of *Bacillus* probiotics on intestinal T-cell migration in weaned MUC4 resistant pigs following *Escherichia coli* challenge. *Vet. Res.* 47: 71.
  - Ying DY, Phoon MC, SanguanRCi L, Weerakkody R, Burgar I, Augustin MA. 2010. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. *J. Food Sci.* 75: 588-595.
  - Yoon HS, Kweon DK, Lim ST. 2007. Effects of drying process for amorphous waxy maize starch on theophylline release from starch-based tablets. *J Appl Polym Sci.* 105:1908–1913.
  - Yu HF, Wang AN, Li XJ, Qiao SY. 2008. Effect of viable *Lactobacillus fermentum* on the growth performance, nutrient digestibility and immunity of weaned pigs. *J Anim Feed Sci.* 17:61–69.
  - Zaragoza LEO. 2009. Evaluation of the accuracy of simple body measurements for live weight prediction in growing-finishing pigs. MSc. Diss. Univ. of Illinois.
  - Zarate G, Nader-Macias ME. 2006. Viability and biological properties of probiotic vaginal lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules. *Process Biochem.* 41(8):1779–1785.
  - Zhang L, Xu JQ, Liu HL, Lai T, Ma JL, Wang JF, Zhu IH. 2010. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG using an *Escherichia coli* K88 model of piglet diarrhoea: effects on diarrhoea incidence, faecal microflora and immune responses. *Veterinary Microbiology.* 141:142-148.
  - Zhang W, Zhu YH, Zhou D, Wu Q, Song D, Dicksved J, Wang JF. 2016. Oral administration of a select mixture of *Bacillus* probiotics affects the gut microbiota and goblet cell function in newly weaned MUC4 resistant pigs following *Escherichia coli* challenge. *Appl. Env. Microbiol.* 83 (3) e02747-16
  - Zhang ZF, Lee JM, Kim IH. 2014. Effects of *Enterococcus faecium* DSM 7134 on weanling pigs were influenced by dietary energy and crude protein density *Livest. Sci.* 169:106-111.

- Zhao , Zhong, J, Wei C, Lin W., Ding T. 2017. Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens. *Front. Microbiol.* 8:1–16.
- Zimmermann JA, Fusari ML, Rossler E, Blajman JE, Romero-Scharpen A, Astesana DM, Olivero CR, Berisvil AP, Signorini ML, Zbrun MV, Frizzo LS, Soto LP. 2016. Effects of probiotics in swines growth performance: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Animal Feed Science Technology.* 219: 280-293.
- Zimmermann JA, Fusari ML, Berisvil AP, Sirini NE, Romero Scharpen A, Olivero CR, Soto LP. Utilización de *Lactobacillus reuteri* DSPV002C para la inhibición *in vitro* de *Campylobacter* termotolerantes aislados de cerdos. XVIII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario. Casilda y Zavalla, 12 y 13 de septiembre de 2017.
- Zuidam N, Shimoni, E. 2009. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to take them. En: Zuidam NJ, Nedovic V, Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Springer-Verlag. New York Inc. p. 3–29.



## **8. Anexos**

## 8.1. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

### ARTÍCULOS PUBLICADOS

- 2016. **Zimmermann JA**, Fusari ML, Rossler E, Blajman JE, Romero-Scharpen A, Astesana DM, Olivero CR, Berisvil AP, Signorini ML, Zbrun MV, Frizzo LS, Soto LP. Effects of probiotics in swines growth performance: A meta-analysis of randomised controlled trials. Anim. Feed Science and Technology. 219:280-293.

### PRESENTACIONES A CONGRESOS Y JORNADAS

- 2019. **Zimmermann JA**, Fusari ML, Olivero CR, Soto LP, Signorini ML, Rosmini MR, Martí LE, Stassi A, Frizzo LS. Influencia de la suplementación con cápsulas probióticas sobre los parámetros sanguíneos de lechones en recría. VII Jornada de Difusión de la Investigación y Extensión. Facultad de Cs. Veterinarias – Universidad Nacional del Litoral (FCV - UNL). 13 de noviembre de 2019, Esperanza – Santa Fe.
- 2019. **Zimmermann JA**, Fusari, ML, Martí E, Frizzo LS, Stoppani C, Roldan L, Sirini N, Soto LP. Administración de cápsulas probióticas a cerdos en recría: colonización intestinal y modulación de la microbiota. XV Congreso Argentino de Microbiología (CAM 2019). 25 al 27 de septiembre de 2019, Ciudad autónoma de Bs. As.