

Sucesión bacteriana del tracto digestivo del lechón alimentado con ensilado biológico

Bacterial succession of the digestive tract of a piglet fed with biological silage

Héctor Sánchez Suárez^{1,3}, Fredy Fabián Domínguez¹, Gloria Ochoa Mogollón¹,
Rubén Alfaro Aguilera²

RESUMEN

Se evaluó mediante análisis metagenómico la composición y abundancia de la microbiota bacteriana en tres porciones del tracto gastrointestinal de un lechón, en el alimento balanceado y en ensilados biológicos preparados con residuos de origen acuícola. Se extrajo el ADN de las muestras y se procedió con la secuenciación. La mayor diversidad bacteriana estuvo en el alimento balanceado (44.7%), predominando *Candidatus phytoplasma surgarcane*. En el ensilado biológico predominaron las especies *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis*. La diversidad existente fue similar entre el ensilado y el alimento. Se encontró similitudes entre las bacterias de las tres regiones gastrointestinales (*L. ultunensis*, *Selenomonas bovis*, *Prevotella copri*, *Enterococcus lactis* y *Campylobacter* sp). En el estómago hubo predominio de *Helicobacter rappini* y *Campylobacter coli*, en intestino delgado *Selenomonas bovis* y *Lactobacillus ultunensis* y en el recto (heces) predominio de *Lactobacillus ultunensis* y *Prevotella copri*.

Palabras clave: metagenómica; ensilado biológico; lactobacilo; sucesión bacteriana

ABSTRACT

The composition and abundance of the bacterial microbiota in three portions of the gastrointestinal tract of a piglet, in the balanced feed and in biological ensilages prepared with residues of aquaculture origin were evaluated by metagenomic analysis. The DNA of the samples was extracted, and sequenced. The greatest bacterial diversity was in the

¹ Departamento Académico de Sanidad Vegetal y Producción Pecuaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Tumbes, Perú

² Departamento de Biología y Bioquímica, Facultad de Salud, Universidad Nacional de Tumbes, Perú

³ E-mail: hsanchezs@untumbes.edu.pe

Recibido: 11 de abril de 2018

Aceptado para publicación: 10 de octubre de 2018

balanced feed (44.7%), with the predominance of *Candidatus phytoblastus surgarcane*. In the biological silage predominated *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*. The existing diversity was similar between silage and the concentrate feed. Similarities were found between the bacteria of the three gastrointestinal regions (*L. ultunensis*, *Selenomonas bovis*, *Prevotella copri*, *Enterococcus lactis* y *Campylobacter* sp). In the stomach predominated *Helicobacter rappini* and *Campylobacter coli*, in the small intestine *Selenomonas bovis* and *Lactobacillus ultunensis* and in the rectum (faeces) *Lactobacillus ultunensis* and *Prevotella copri*.

Key words: metagenomics; biological silage; lactobacilli; bacterial succession

INTRODUCCIÓN

El tracto digestivo se coloniza de bacterias a partir del nacimiento del animal, y progresa dependiendo de su ambiente de desarrollo y fuente de alimentación (De Lange *et al.*, 2010). Posteriormente, estas bacterias se naturalizan, se hacen facultativas y permanentes o se mantienen durante un determinado tiempo de la vida del animal, según la región del tracto intestinal (Fraune y Bosch, 2010; Slifierz *et al.*, 2015). Esta colonización tiene un gran impacto en el estado de salud de los animales, donde ayuda, además, a la maduración del tracto gastrointestinal y cumple un rol importante en el sistema inmunológico (Gardiner *et al.*, 2004; Rosmini *et al.*, 2004; Round y Mazmanian, 2009; Chow *et al.*, 2010; Gebert *et al.*, 2011); generando adicionalmente procesos de exclusión competitiva frente a patógenos y, por otro lado, convierten sustancias no digeribles en componentes digeribles que benefician al huésped (Guarner 2007; Ley *et al.*, 2008).

Estudios realizados por Frese *et al.* (2015), muestran que las comunidades microbianas en lechones lactantes hasta los 21 días de edad son relativamente estables a nivel de familia, siendo más abundantes las poblaciones de Bacteroidaceae, Clostridiaceae, Lachnospiraceae, Lactobacillaceae

y Enterobacteriaceae. A partir del día 28, las poblaciones de Bacteroides y Enterobacteriaceae declinan e incrementan las poblaciones de Lactobacillaceae, Ruminococcaceae, Veillonellaceae y Preotellaceae (Koenig *et al.*, 2011). Por otro lado, cuando ocurren casos de cuadros patológicos como diarrea porcina, la diversidad microbiana es afectada, disminuyendo las bacterias correspondientes al Phyla Actinobacteria y Firmicutes, mientras que aquellas del género *Enterococcus* y bacterias de la familia Enterobacteriaceae son más abundante (Hermann-Bank *et al.*, 2015; Klose *et al.*, 2010).

La metagenómica permite analizar hasta un 99% la información genética de la gran mayoría de microorganismos que no son cultivables en condiciones de laboratorio (Villamil, 2016). Así mismo, permite estudiar un nicho en particular, conocer qué tipo de bacterias coloniza en determinado ambiente y proporciona información para poder asociar actividades microbianas a ciertas poblaciones (Castillo y Guzmán, 2017)

La presente investigación permitió evaluar, mediante metagenómica, la composición y abundancia de la microbiota bacteriana en varias porciones del tracto gastrointestinal de lechones, asociado con el aporte microbiano del alimento balanceado estándar y la utilización de ensilados biológicos preparados con residuos de origen acuícola.

MATERIALES Y MÉTODOS

De la granja porcina del Centro Pecuário de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Tumbes, se seleccionó al azar un lechón cruzado, madre Landrace x Pietrain y padre Yorkshire, de 28 días de edad, siete días de haber sido destetado, en buen estado de salud y peso. El animal comenzó a recibir concentrado *ad libitum* siete días antes del destete. El alimento era preparado en granja utilizando como base maíz, soya y polvillo de arroz (Cuadro 1), cuyo contenido proteico fue de 18% teórico (15.2% analizado). Además, se incorporó 15% adicional de ensilado biológico de residuos del procesamiento de langostino, fermentado con *Lactobacillus brevis* nativo.

En la obtención del ensilado biológico cocido (E2) se utilizó como materia prima la cabeza de langostino. Para disminuir la carga microbiana se pasó por un hervor hasta cambio de color (5 a 10 min), se mezcló según tratamientos 70% del residuo cocinado (langostino) como sustrato, 25% de melaza o polvillo de arroz y 5% de leche con el inóculo bacteriano preparado (*Lactobacillus brevis* nativo), 0.1 ml/l leche. La mezcla total se colocó en depósitos plásticos de 200 L de capacidad, tapándose herméticamente, dejando un 25% de espacio libre entre el producto y la tapa.

Para el análisis bromatológico se colectó 100 g del ensilado E2 y de la dieta, y se remitió al Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos (LENA) de la Universidad Agraria La Molina (UNALM) (Cuadro 2). Para los fines del estudio, se consideró como ensilado E1 el ensilado biológico crudo.

El lechón fue anestesiado con ketamina, en dosis 3 mg/kg de peso vivo, vía i.v., para realizar una laparotomía. Se tomaron muestras de mucosa y contenido del estómago, intestino delgado, recto (heces) con hisopos estériles. De igual manera, se colectaron muestras de ensilado biológico y alimento

Cuadro 1. Insumos de dieta utilizada en la alimentación de lechones

Ingredientes	kg
Grano de maíz	39.24
Harina de algodón	3.00
Aceite	0.50
Polvillo de arroz	23.71
H. de soja 48%	16.50
H. de pescado, AAFCO	5.00
Concha de ostra	1.00
Sal común	0.50
Premezcla vitamínica	0.05
Premezcla mineral	0.50
Melaza de caña	10.00
Ensilado residuo langostino (E2)	15.00
Total	115.0

Contenido de proteína 15.22%, según el Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos (LENA) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM)

Cuadro 2. Contenido nutricional del ensilado experimental E2

Nutriente	Contenido
Humedad (%)	61.12
Proteína (%)	42.86
Grasa (%)	8.36
Fibra (%)	12.42
Cenizas (%)	15.05
ELN (%)	12.72

Fuente: Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos (LENA), Universidad Agraria La Molina (UNALM)

balanceado. Todas las muestras fueron trasladadas en cadena de frío hasta las instalaciones de Inca Biotec S.A.C. (Tumbes), para la extracción del ADN metagenómico.

El ADN metagenómico de las muestras fue extraído con PowerSoil™ DNA Isolation-

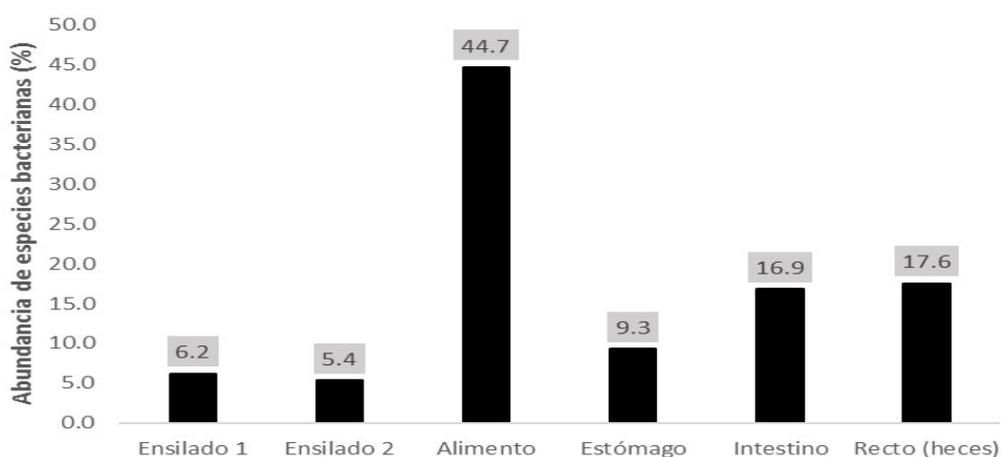


Figura 1. Abundancia de especies bacterianas (%) en tres matrices biológicas en el lechón (contenido estomacal, intestinal y rectal), en el concentrado, ensilado biológico E1 (residuo crudo) y E2 (residuo precocido).

Kit (MO BIO Laboratories), siguiendo las recomendaciones del fabricante, incluido en el protocolo del laboratorio INCABiotec (Perú). La presencia del ADN extraído fue verificada en geles de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (0.5 g/ml) y por electroforesis en buffer TAE 1X. Las muestras de ADN fueron remitidas a Mr. DNA Lab. (Molecular Research LP, EEUU), para la secuenciación de metagenomas (*Metagenomic Shotgun Sequencing*) (16S rRNA Sequencing) mediante la tecnología Diversity Assay bTEFAP® Illumina (Dowd *et al.*, 2008). Los resultados fueron procesados en una hoja Excel, obteniéndose gráficos de porcentaje de abundancia y diversidad.

RESULTADOS

Se evaluaron seis matrices biológicas, identificándose especies bacterianas cultivables, no cultivables e incluso aquellas que aún no han sido caracterizadas. El mayor número de especies bacterianas identificadas correspondió a la muestra de alimento balanceado (685 bacterias, 44.7%). Por otro lado, la menor cantidad de cepas identificadas

correspondieron a las muestras de ensilados biológicos (E1 y E2) (Figura 1).

La composición de la flora bacteriana en las matrices en estudio fue variable, predominando *Candidatus phytobacteria* Sugarcane (35% de abundancia) en el alimento balanceado y *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis* (32 y 42%, respectivamente) en los ensilados E1 (con residuos crudos) y E2 (con residuos precocidos). Por otro lado, en el tracto digestivo se obtuvo *Helicobacter rappini* y *Campylobacter coli* con mayor abundancia en el estómago, *Selenomonas bovis* y *Lactobacillus ultunensis* en el intestino delgado y *Lactobacillus ultunensis* y *Prevotella copri* en el recto (heces) (Cuadro 2).

En los ensilados biológicos se observó la predominancia de bacterias del género *Lactobacillus* (*L. casei*) y *Lactococcus* (*L. lactis*). Comparando el ensilado E2 con el alimento balanceado, existe similitud de especies bacterianas, entre ellas *L. pontis* y *Enterococcus faecalis*. Por otro lado, aun cuando el ensilado biológico aporta diferentes especies de bacterias del género *Lacto-*

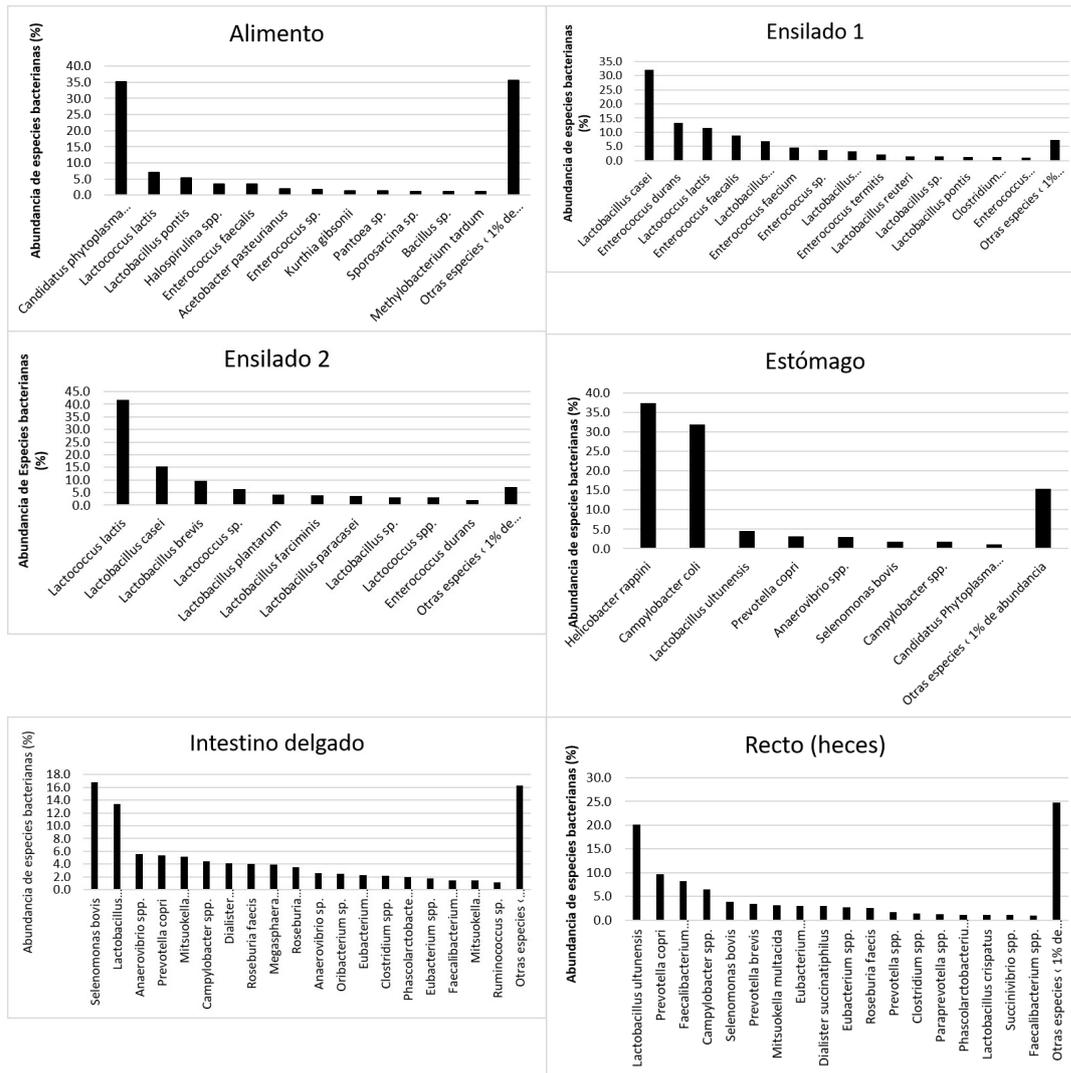


Figura 2. Composición de la flora bacteriana por las matrices biológica de los ensilados E1 (residuo crudo) y E2 (residuo precocido), del alimento balanceado, y de los contenidos estomacal, intestinal y del recto (heces) de un lechón

bacillus, estas no son predominantes en el tracto gastrointestinal del lechón. Así tenemos, que *L. ultunensis*, además de *Selenomonas bovis*, *Prevotella copri*, *Enterococcus lactis* y *Campylobacter spp* predominan en estómago, intestino delgado y recto (heces) (Cuadro 3).

DISCUSIÓN

Los estudios de la microflora bacteriana en animales de cría se enfocan principalmente en la evaluación de bacterias cultivables en medios de cultivo generales y específicos (Deusch *et al.*, 2015). Sin embargo, actual-

Cuadro 3. Sucesión de poblaciones bacterianas en las matrices biológica de los ensilados E1 (residuo crudo) y E2 (residuo precocido), del alimento balanceado, y de los contenidos estomacal, intestinal y del recto (heces) de un lechón

Población bacteriana	Ensilado 1	Ensilado 2	Alimento	Estómago	Intestino	Recto
<i>Lactobacillus casei</i>	32.1	15.3	-	-	-	-
<i>Enterococcus durans</i>	13.3	2.0	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	11.6	41.8	7.1	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	8.8	-	3.4	-	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	6.9	3.6	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	4.7	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus sp</i>	3.7	-	1.8	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3.2	4.2	-	-	-	-
<i>Enterococcus termitis</i>	2.1	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	1.5	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sp</i>	1.4	3.1	-	-	-	-
<i>Lactobacillus pontis</i>	1.3	-	5.4	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	1.2	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus raffinosus</i>	1.0	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	-	9.6	-	-	-	-
<i>Lactobacillus farciminis</i>	-	3.8	-	-	-	-
<i>Lactococcus sp</i>	-	6.4	-	-	-	-
<i>Lactococcus spp</i>	-	3.0	-	-	-	-
<i>Sporosarcina sp</i>	-	-	1.2	-	-	-
<i>Pantoea sp</i>	-	-	1.3	-	-	-
<i>Methylobacterium tardum</i>	-	-	1.1	-	-	-
<i>Kurthia gibsonii</i>	-	-	1.4	-	-	-
<i>Halospirulina spp</i>	-	-	3.5	-	-	-
<i>Candidatus Phytoplasma sugarcane</i>	-	-	35.1	1.1	-	-
<i>Bacillus sp</i>	-	-	1.2	-	-	-
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	-	-	2.0	-	-	-
<i>Anaerovibrio spp</i>	-	-	-	3.0	5.5	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	-	-	31.9	-	-
<i>Campylobacter spp</i>	-	-	-	1.8	4.5	6.6
<i>Helicobacter rappini</i>	-	-	-	37.4	-	-
<i>Lactobacillus ultunensis</i>	-	-	-	4.5	13.4	20.1
<i>Prevotella copri</i>	-	-	-	3.2	5.4	9.7
<i>Selenomonas bovis</i>	-	-	-	1.8	16.8	3.9
<i>Mitsuokella multacida</i>	-	-	-	-	5.1	3.2
<i>Dialister succinatiphilus</i>	-	-	-	-	4.2	3.0
<i>Roseburia faecis</i>	-	-	-	-	4.1	2.6
<i>Megasphaera elsdenii</i>	-	-	-	-	3.9	-
<i>Roseburia intestinalis</i>	-	-	-	-	3.5	-
<i>Anaerovibrio sp</i>	-	-	-	-	2.6	-
<i>Oribacterium sp</i>	-	-	-	-	2.4	-
<i>Eubacterium ruminantium</i>	-	-	-	-	2.3	3.0
<i>Clostridium spp</i>	-	-	-	-	2.1	1.3
<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	-	-	-	-	2.0	1.1
<i>Eubacterium spp</i>	-	-	-	-	1.8	2.7
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	-	-	-	-	1.4	8.3
<i>Mitsuokella jalaludinii</i>	-	-	-	-	1.4	-
<i>Ruminococcus sp</i>	-	-	-	-	1.1	-
<i>Prevotella brevis</i>	-	-	-	-	-	3.5
<i>Prevotella spp</i>	-	-	-	-	-	1.6
<i>Paraprevotella spp.</i>	-	-	-	-	-	1.3
<i>Lactobacillus crispatus</i>	-	-	-	-	-	1.1
<i>Succinivibrio spp</i>	-	-	-	-	-	1.1
<i>Faecalibacterium spp</i>	-	-	-	-	-	1.0
Otras especies < 1% de abundancia	7.3	7.2	35.6	15.4	16.2	24.8
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

mente existen técnicas moleculares como la metagenómica que permiten conocer la diversidad y estimar la abundancia de microorganismos, tanto cultivables como no cultivables (Escobar-Zepeda *et al.*, 2015). En esta investigación, se describen las especies bacterianas relacionadas con el tracto intestinal del lechón y su relación con las procedentes del alimento balanceado con ensilados biológicos basados en la fermentación generada por bacterias ácido lácticas. Para esto, Kenworthy y Crabb (1963) y Hong (2011) refieren que la colonización bacteriana del aparato gastrointestinal comienza al nacer, cuando el lechón empieza a lactar, y esto está influenciado, además, por el ambiente, la genética de los reproductores y el modo de suministro del alimento balanceado.

Los resultados indican que el alimento balanceado presenta una mayor diversidad de bacterias, comparado con el ensilado y las muestras de contenido intestinal. Esto se debe posiblemente a la naturaleza y calidad de cada uno de los componentes que integran el alimento para animales, que incluye fuente de glúcidos (polvillo, nielen, melaza, maíz), proteínas (torta de soya, pasta de algodón, harina de pescado) y lípidos (aceite de pescado), entre otros aditivos; que aportan microorganismos de diversos orígenes y en diferentes proporciones. Knarreborg *et al.* (2002) y Lamendela *et al.* (2011) mencionan que el microbioma intestinal de los animales está relacionado, entre otros, con la dieta y la calidad de los insumos utilizados en su preparación. Así mismo, Scott *et al.* (2013) indican que la cantidad, tipo y balance de micronutrientes principales de la dieta (glúcidos, proteínas y grasas) tienen un gran impacto en la microbiota intestinal. Otros estudios consideran que el balanceado para animales no es el principal medio que aporta la flora bacteriana al lechón, pues además ocurre a través de la ingesta de las heces de la madre, que dan un gran aporte de microorganismos benéficos y hasta patógenos (Jensen, 1998).

Los ensilados evaluados presentaron una menor diversidad microbiana, debido posiblemente al proceso fermentativo que requiere este producto, el cual es selectivo para algunas especies bacterianas microaerófilas y anaeróbicas (Ridwan *et al.*, 2015). Dentro de estas, las bacterias de los géneros *Lactobacillus* (Melgarejo y Velásquez, 2016) y *Clostridium* presentes en este estudio, cuya predominancia radica en *L. lactis* y *L. casei*. Los estudios de Pérez *et al.* (2007) y Partanen y Mroz (1999) demostraron que estas últimas especies producen metabolitos antimicrobianos que pueden reemplazar a los antibióticos utilizados en la dieta de lechones destetados. Asimismo, *L. lactis* es utilizada como bacteria recombinante que expresa el factor de crecimiento epidérmico porcino (LL-pEGF, por sus siglas en inglés) y es utilizado de manera oral en lechones recién destetados, para estimular el desarrollo intestinal, mediante la regulación positiva de la expresión génica de las proteínas de integridad intestinal, las enzimas digestivas y el transporte de nutrientes (Xu *et al.*, 2015).

Aun cuando los preparados de ensilados biológicos se iniciaron a partir de ciertas especies del género *Lactobacillus*, se presenta el crecimiento de otras especies bacterianas con capacidad probiótica, las que pueden provenir de los insumos utilizados para su preparación. Así se tiene *L. ultunensis*, que según los resultados obtenidos predomina principalmente en el intestino de los lechones, y no formó parte del inóculo inicial necesario para preparar el ensilado. *L. ultunensis* ha sido aislada a partir de biopsias de mucosa del estómago de humanos sanos (Roos *et al.*, 2005). En forma similar, también ha sido aislada a partir de heces de cerdos y evaluada como posible especie bacteriana con potencial probiótico en esta especie de crianza (de Angelis *et al.*, 2006).

En el tracto gastrointestinal del lechón, específicamente en el estómago, se obtuvo predominancia de *Helicobacter rappini*. Esta bacteria ha sido aislada principalmente

en gatos, perros, ratones, ovejas y cerdos (Whary y Fox, 2004). En humanos fue reportado en pacientes con inmunosupresión, generando septicemia bacteriana y enteritis (Tee *et al.*, 2001). Por otro lado, la flora bacteriana del tracto gastrointestinal es predominantemente Gram negativa, que incluye a los géneros *Selenomonas* y *Prevotella* como las frecuentemente aisladas a partir del contenido intestinal de cerdos. Según Schaechter (2004), estas bacterias generan un impacto significativo en el metabolismo energético de los cerdos que consumen una dieta rica en granos y fibras, y mejoran la tasa de absorción de ácidos grasos volátiles en el ciego y colon.

CONCLUSIONES

- Cada uno de los grupos bacterianos identificados es diverso y se encuentran en diferentes proporciones, predominando algunos grupos que permiten mejorar la salud de los cerdos y ayudan al metabolismo de los nutrientes, Por otro lado, algunos de ellos pueden generar impacto negativo en la cría de cerdos con la proliferación de enfermedades de origen bacteriana.
- Se determinó la presencia de microorganismos propios en cada región del tracto digestivo.
- Se encontraron bacterias de las mismas especies en las tres regiones del tracto digestivo, incluyendo algunas con capacidad probiótica.
- Existe una abundante cantidad de lactobacilos en el ensilado biológico de residuos del procesamiento de langostino.

LITERATURA CITADA

1. **Castillo SG, Guzmán G. 2017.** Creación de una librería metagenómica del aparato digestivo de *Chrysoperla carnea*. Jóvenes en la Ciencia 3: 963-968.
2. **Chow J, Lee SM, Shen Y, Khosravi A, Mazmanian SK. 2010.** Host-bacterial symbiosis in health and disease. Adv Immunol 107: 243-274. doi: 10.1016/B978-0-12-381300-8.00008-3
3. **de Angelis M, Siragusa S, Berloco M, Caputo L, Settanni L, Alfonsi G, Amerio M, et al. 2006.** Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. Res Microbiol 157: 792-801. doi: 10.1016/j.resmic.2006.05.003
4. **De Lange CFM, Pluske J, Gong J, Nyachoti CM. 2010.** Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. Livest Sci 134: 124-134. doi: 10.1016/j.livsci.2010.06.117
5. **Deusch S, Tilocca B, Camarinha-Silva A, Seifert J. 2015.** News in livestock research - use of Omics-technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals. Comput Struc Biotechnol J 13: 55-63. doi: 10.1016/j.csbj.2014.12.005
6. **Dowd SE, Sun Y, Wolcott RD, Domingo A, Carroll JA. 2008.** Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned *Salmonella*-infected pigs. Foodborne Pathog Dis 5: 459-472. doi: 10.1089/fpd.2008.0107
7. **Escobar-Zepeda A, Vera-Ponce A, Sanchez-Flores A. 2015.** The road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. Front Genetics 6: 348. doi: 10.3389/fgene.2015.00348
8. **Fraune S, Bosch TC. 2010.** Why bacteria matter in animal development and evolution. Bioessays 32: 571-580. doi: 10.1002/bies.200900192
9. **Frese SA, Parker K, Calvert CC, Mills DA. 2015.** Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. Microbiome 3: 28. doi: 10.1186/s40168-015-0091-8

10. **Gebert S, Davis E, Rehberger T, Maxwell C. 2011.** *Lactobacillus brevis* strain 1E1 administered to piglets through milk supplementation prior to weaning maintains intestinal integrity after the weaning event. *Benef Microbes* 2: 35-45. doi: 10.3920/BM2010.0043
11. **Gardiner GE, Casey PG, Casey G, Lynch PB, Lawlor PG, Hill C, Fitzgerald GF, et al. 2004.** Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Appl Environ Microb* 70: 1895-1906. doi: 10.1128/AEM.70.4.1895-1906.2004
12. **Guarner F. 2007.** Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutr Hosp* 22(Suppl 2): 14-19.
13. **Hermann-Bank ML, Skovgaard K, Stockmarr A, Strube ML, Larsen N, Kongsted H, Boye M. 2015.** Characterization of the bacterial gut microbiota of piglets suffering from new neonatal porcine diarrhoea. *BMC Vet Res* 11: 139. doi: 10.1186/s12917-015-0419-4
14. **Hong T, Passoth V, Lindberg J. 2011.** Bacterial diversity at different sites of the digestive tract of weaned piglets fed liquid diets. *Asian Austral J Anim Sci* 24: 834-843. doi: 10.5713/ajas.2011.10291
15. **Jensen BB. 1998.** The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *J Anim Feed Sci* 7(Suppl 1): 45-64. doi: 10.22358/jafs/69955/1998
16. **Kenworthy R, Crabb WE. 1963.** The intestinal flora of young pigs, with reference to early weaning, *Escherichia coli* and scours. *J Comp Pathol Therap* 73: 215-228. doi: 10.1016/S0368-1742(63)-80025-9
17. **Klose V, Bayer K, Bruckbeck R, Schatzmayr G, Loibner A. 2010.** *In vitro* antagonistic activities of animal intestinal strains against swine-associated pathogens. *Vet Microbiol* 144: 515-521. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.02.025
18. **Knarreborg A, Simon MA, Engberg RM, Jensen BB, Tannock GW. 2002.** Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Appl Environ Microb* 68: 5918-5924. doi: 10.1128/AEM.68.12.5918-5924.2002
19. **Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, et al. 2011.** Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *P Natl Acad Sci USA* 108(Suppl 1): 4578-4585. doi: 10.1073/pnas.1000081107
20. **Lamendela R, Domingo JW, Ghosh S, Martinson J, Oerther DB. 2011.** Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. *BMC Microbiol* 11: 103. doi: 10.1186/1471-2180-11-103
21. **Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI. 2008.** Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 6: 776-788. doi: 10.1038/nrmicro1978
22. **Melgarejo Velásquez GY. 2016.** Caracterización de bacterias ácido lácticas aisladas del intestino de *Litopenaeus vannamei* cultivados en sistema intensivo en Tumbes - Perú y su potencial uso como probióticos. Tesis de Biólogo Acuicultor. Nuevo Chimbote, Perú: Univ. Nacional del Santa. 28 p.
23. **Partanen KH, Mroz Z. 1999.** Organic acid for performance enhancement in pig diets. *Nutr Res Rev* 12: 117-145. doi: 10.1079/095442299108728884
24. **Pérez N, Fajardo P, Méndez J, Cachaldora P, Pastrana L. 2007.** Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Anim Feed Sci Tech* 134: 89-107. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.05.010
25. **Ridwan R, Rusmana I, Widyastuti Y, Wiryawan KG, Prasetya B, Sakamoto M, Ohkuma M. 2015.** Fermentation characteristics and microbial diversity of

- tropical grass-legumes silages. *Asian Austral J Anim* 28: 511-518. doi: 10.5713/ajas.14.0622
26. **Roos S, Engstrand L, Jonsson H. 2005.** *Lactobacillus gastricus* sp. nov., *Lactobacillus antri* sp. nov., *Lactobacillus kalixensis* sp. nov. and *Lactobacillus ultunensis* sp. nov., isolated from human stomach mucosa. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 77-82. doi: 10.1099/ijs.0.63083-0
27. **Round JL, Mazmanian SK. 2009.** The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 313-323. doi: 10.1038/nri2515
28. **Rosmini MR, Sequeira GJ, Guerrero I, Martí LE, Dalla R, Frizzo L, Bonazza JC. 2004.** Producción de prebióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Rev Mex Ing Quim* 3: 181-191.
29. **Scott K, Gratz S, Sheridan P, Flint H, Duncan S. 2013.** The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res* 69: 52-60. doi: 10.1016/j.phrs.2012.10.020
30. **Schaechter M. 2004.** The desk encyclopedia of microbiology. China: Elsevier. 1157 p.
31. **Slifierz MJ, Friendship RM, Weese JS. 2015.** Longitudinal study of the early-life fecal and nasal microbiota of the domestic pig. *BMC Microbiol* 15: 184. doi: 10.1186/s12866-015-0512-7
32. **Tee W, Jenney A, McPhee A, Mijch A, Dyall-Smith M. 2001.** «*Helicobacter rappini*» isolates from 2 homosexual men. *Clin Infect Dis* 33: e8-e11. doi: 10.1086/320881
33. **Villamil C, del Portillo P, Monguí A. 2016.** Clonación, expresión y caracterización de una nueva esterasa derivada de metagenomas de suelos agrícolas colombianos. *Rev Colomb Biotecnol* 18: 48-55. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61520
34. **Whary M, Fox J. 2004.** Natural and experimental *Helicobacter* infections. *Comp Med* 54: 128-158.
35. **Xu S, Wang D, Zhang P, Lin Y, Fang Z, Che L, Wu D. 2015.** Oral administration of *Lactococcus lactis*-expressed recombinant porcine epidermal growth factor stimulates the development and promotes the health of small intestines in early-weaned piglets. *J Appl Microbiol* 119: 225-235. doi: 10.1111/jam.12833