

**Efecto de antibióticos y glutamina en la
microbioma intestinal y eficiencia alimenticia
en lechones estresados por el destete y
traslado hacia la granja porcina**

Ruth Eunice Centeno Martinez

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Efecto de antibióticos y glutamina en la
microbioma intestinal y eficiencia alimenticia
en lechones estresados por el destete y
traslado hacia la granja porcina**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera Agrónoma en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Ruth Eunice Centeno Martinez

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2018

Efecto de los antibióticos y glutamina en la microbioma intestinal y eficiencia alimenticia en lechones estresados por el destete y transporte hacia la granja porcina

Ruth Eunice Centeno Martinez

Resumen. El estrés por destete y traslado hacia la granja porcina provoca el padecimiento de enfermedades gastrointestinales en lechones, afectando su crecimiento y desarrollo futuro. El uso de antibióticos ayuda a mejorar la salud intestinal. No obstante, estos compuestos provocan que las bacterias desarrollen genes de resistencia, impulsando la búsqueda de sustitutos para control de estos organismos. Para este estudio, se utilizó la glutamina como un nuevo sustituto. Se evaluaron tres tratamientos: antibiótico, glutamina y sin tratamiento para conocer su efecto en la microbioma intestinal. Se sacrificó un lechón por corral en los días 0, 13 y 33 post-destete en verano 2016 y primavera 2017. Se recolectó secreción del íleon y se extrajo ADN bacteriano utilizando como indicador el gen 16S rRNA y se realizó la identificación taxonómica de las bacterias encontradas. Se observó que los antibióticos y glutamina no afectan la composición bacteriana en el íleon en los días evaluados. Se evidenció un cambio en la composición bacteriana en los lechones sin tratamiento como resultado de la sucesión microbiana que ocurre en el animal. No se observó un cambio en la riqueza y abundancia bacteriana en la época del verano 2016, mientras que en primavera 2017, la glutamina y antibiótico provocaron un cambio en dichas variables. Finalmente, se identificó que el género *Clostridium* sensu stricto ayuda en la eficiencia alimenticia del animal, pero el género *Butyricoccus* y bacterias de la familia Enterobacteriaceae pueden afectar de forma negativa la eficiencia alimenticia.

Palabras clave: 16S rRNA, población alfa, salud intestinal, sucesión microbiana.

Abstract. Stress triggered by weaning and transport causes gastrointestinal diseases in piglets, affecting their growth and future development. The use of antibiotics improves intestinal health. Nevertheless, the constant use of these compounds aids bacteria in the development of resistance genes, thrusting the search for substitutes for the control of these organisms. For this research, glutamine was used as a new substitute. Several dietary treatments were evaluated: antibiotics, glutamine, and no treatment to know the effects of each on the intestinal microbiome. One piglet was slaughtered per pen on days 0, 13, and 33 after weaning during summer 2016 and spring 2017. Secretion from the ileum was gathered and bacterial DNA was extracted using the gene 16S rRNA, and a taxonomic identification of the bacteria found was executed. It was observed that the antibiotics and the glutamine do not affect the bacterial composition inside the ileum in the days studied. However, a change was evidenced in the bacterial composition in piglets without treatment as a result of microbial succession taking place in the animal. A change in the microbial richness and abundance was not evidenced during summer 2016; during spring 2017, glutamine and antibiotics produced a change in said variables. Finally, it was identified that the genus *Clostridium* sensu stricto help in the animal's feed efficiency, but the genus *Butyricoccus* and bacteria of the family Enterobacteriaceae can negatively affect feed efficiency.

Key words: 16S rRNA, alpha diversity, intestinal health, microbial succession.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. METODOLOGÍA	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
4. CONCLUSIONES	28
5. RECOMENDACIONES	29
6. LITERATURA CITADA.....	30
7. ANEXOS	36

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Distribución de los lechones en corrales durante las temporadas de verano 2016 y primavera 2017 en la granja porcina de la Universidad de Purdue, Estados Unidos.....	4
2. Composición de los tratamientos dietéticos utilizados en las temporadas de verano 2016 y primavera 2017 en la granja porcina de la Universidad de Purdue, Estados Unidos	4
3. Recolección de muestras de fleon de lechón en la temporada de verano 2016 y primavera 2017, en la granja porcina de la Universidad de Purdue, Estados Unidos.....	5
4. Comparación de OTU presente en los días 0, 13 y 33 post-destete, bajo el efecto de los tratamientos dietéticos, durante la temporada de verano 2016.	13
5. Comparación de OTU presentes en los tres tratamientos dietéticos al día 13 y 33 post-destete y transporte durante la temporada de verano 2016.....	14
6. Comparación de OTU presentes en los tres tratamientos dietéticos al día 13 y 33 post-destete y transporte durante la temporada de primavera 2017.	15
7. Comparación de OTU presentes en los días 0, 13 y 33 post-destete, bajo el efecto de los tratamientos dietéticos, durante la temporada de primavera 2017.....	15
8. Análisis de la riqueza de la composición bacteriana presente en la población alfa entre tratamiento y días en la temporada del verano 2016.	16
9. Análisis de la abundancia relativa de la composición bacteriana presente en la población alfa entre tratamiento y días en la temporada del verano 2016.	16
10. Análisis de Tukey sobre la abundancia relativa de la composición bacteriana presente en la población alfa entre tratamiento y días en la temporada del verano 2016.	17
11. Análisis de la riqueza en el número de especies bacterianas presente en la población alfa entre tratamiento y días en la temporada de primavera 2017.	18
12. Análisis de Tukey sobre riqueza en el número de especies bacterianas presente en la población alfa entre tratamiento y días en la temporada de primavera 2017.	18
13. Análisis de la abundancia relativa de la composición bacteriana presente en la población alfa entre tratamiento y días en la temporada de primavera 2017.	19
14. Análisis de Tukey sobre la abundancia composición bacteriana presente en la población alfa entre tratamiento y días en la temporada de primavera 2017.	20

15. Identificación taxonómica de OTU presentes en lechones sin tratamiento en la temporada de primavera 2017.	22
16. Identificación taxonómica de OTU presentes en lechones sin tratamiento en la temporada de verano 2016.....	23
17. Identificación taxonómica de OTU presentes en lechones tratados con antibióticos en la temporada de primavera 2017.....	24
18. Identificación taxonómica de OTU presentes en lechones tratados con Glutamina en ambas temporadas.....	24
19. Resultados de eficiencia alimenticia de lechones bajo los tratamientos dietético y cosechados al día 13 y 33 post-destete, en las temporadas de verano 2016 y primavera 2017.....	25
20. Identificación taxonómica de los OTU correlacionados con el “Gain to Feed ratio”.....	27

Figuras Página

1. Gráfico NMDS, utilizando el método Bray-Curtis donde se observa la distancia y patrones de agrupamiento de las muestras presentes en los tratamientos antibiótico, control y glutamina, en las temporadas de verano 2016 y primavera 2017	12
2. Comportamiento a través del tiempo de los 20 grupos de bacterias, a nivel de género, con mayor abundancia relativa presentes los tratamientos con antibióticos, glutamina y control, evaluados en la temporada de primavera 2017 y verano 2016	21

Anexos Página

1. Visualización de la variabilidad de medias evaluadas sobre la composición bacteriana de las muestras bajo los tratamientos dietéticos en los días 0, 13 y 33 en ambas temporadas.....	36
2. Visualización de la variabilidad de medias evaluadas sobre la composición bacteriana a través del tiempo y bajo el efecto de los tratamientos dietéticos en ambas temporadas	36

1. INTRODUCCIÓN

En la industria porcina, el estrés ocasionado por el destete, representa una etapa crucial para el lechón, debido a que impacta directamente en la morfología, estructura, fisiología y respuesta inmune del intestino. Esto conlleva a una deficiencia en el crecimiento, ingesta, morbilidad y como consecuencia máxima, la muerte (Campbell *et al.* 2013). En la industria en Estados Unidos de América, cuando los lechones son destetados, son movilizados a nuevas granjas donde continuarán con el proceso de engorde. El estrés de transporte, sumado con el estrés del destete, produce deshidratación y pérdida de peso cuando estos son transportados más de seis horas (Sutherland *et al.* 2014).

Un estudio realizado por Moeser *et al.* (2007), notificó que el destete causa daños muy marcados en la función de la barrera intestinal, provocando un incremento en la permeabilidad del intestino en el yeyuno y colon en comparación con lechones que no fueron destetados. El estudio realizado por Pearce *et al.* (2013) demostró que el estrés por fluctuaciones de temperatura al momento del transporte, promueve el incremento de la impermeabilidad intestinal (síndrome de “Leaky gut”), aumentando la susceptibilidad del lechón a ser infectado por las toxinas de agentes patógenos.

Para mantener la salud de la microbioma y función de la barrera intestinal afectada por el estrés del destete y transporte, se opta como principal recurso el uso de antibióticos profilácticos y terapéuticos (Barton 2014). El modo de acción de estos compuestos, se basa en la disminución de la carga bacteriana, ayuda en la absorción de nutrientes y beneficia a las bacterias no antagonistas (Butaye *et al.* 2003; Looft 2012)

La utilización de antibióticos en la dieta de los lechones, actualmente, representa una alarmante situación para el consumidor. La resistencia a los antibióticos, no solamente afecta en la producción, sino puede provocar un impacto en la salud humana. El desarrollo de efecto está relacionado a que puede existir transferencia de organismos resistentes y genes asociados, a través de la ingesta de productos contaminados (Barton 2014) a otros organismo. Como consiguiente, nuevas enmiendas alimenticias se están estudiando y evaluando con el objetivo de obtener el mismo resultado comparado con el uso de antibióticos.

Existen diferentes enmiendas alimenticias que pueden causar el mismo efecto que los antibióticos en la microbiota intestinal. El estudio realizado por Wang *et al.* (2008) comprobó que la suplementación con glutamina mejora la morfología intestinal en lechones destetados. Así mismo, Jiang *et al.* (2009) demostró que la glutamina incrementa la salud intestinal, la función inmune, previene un daño en el intestino, mejora la actividad antibacteriana y aumenta la absorción de nutrientes.

La glutamina es considerada como la mayor fuente de energía para la proliferación y diferenciación de las células epiteliales del intestino (Newsholme *et al.* 2003). Además ayuda en el aumento de la expresión de proteínas presentes en las uniones estrechas del epitelio intestinal que tiene función disminuir la permeabilidad de la barrera intestinal, evitando así, el ingreso de macromoléculas presentes en el lumen, las cuales podrían ocasionar una infección en el huésped (Blikslager *et al.* 2007).

El estudio de la microbioma intestinal se puede enfocar en cinco criterios. Uno de los cuales se basa en el estudio de una comunidad microbiana intestinal estable y normal, (Bischoff 2011). La presencia de bacterias en el intestino es de suma importancia para la salud y desarrollo del lechón, ya que ayuda en el estímulo y desarrollo del sistema inmune del mismo (Isaacson y Kim 2012), degradación de nutrientes y producción de energía en el sistema gastrointestinal y los pone a disposición del huésped (Looft 2012).

Para realizar este estudio, es necesario el análisis de ADN bacteriano, especialmente, la amplificación y secuenciación del gen 16s rRNA. El gen 16s rRNA, es una herramienta molecular que permite la determinación filogenética de bacterias, debido a que es un gen que está presente, de forma universal, en bacterias y ha sufrido modificaciones leves en la secuencia genética a través del tiempo (Patel 2001). Además, la utilización de este gen permite la identificación a nivel de género en bacterias aproximadamente más del 90% de las veces (Drancourt *et al.* 2000).

En el área de la nutrición porcina, el cuidado de la microbiota intestinal puede tener un impacto en la eficiencia alimenticia del animal. Gracias a la aplicación del método de amplificación y secuenciación del gen 16s rRNA, la identificación de la composición bacteriana en el intestino ha tomado importancia en la nutrición animal. Se ha demostrado que existe una relación entre el género bacteriano y el crecimiento del animal, como, por ejemplo: la producción de enzimas digestivas que ayudan en la digestibilidad de la fibra cruda. (Flint y Bayer 2008; Pedersen *et al.* 2013; Niu *et al.* 2015; McCormack 2017)

Para esta investigación, se establecieron los siguientes objetivos:

- ◆ Determinar el efecto de los tres tratamientos: glutamina, antibióticos y no antibióticos, en la microbioma intestinal de los lechones después de haber destetados y transportados hacia la granja porcina.
- ◆ Determinar el cambio en la población alfa bajo el efecto de los tres tratamientos: glutamina, antibióticos y no antibióticos, en la microbioma intestinal de los lechones destetados y transportados hacia la granja porcina.
- ◆ Determinar si la composición de la microbioma intestinal, bajo el efecto de los tratamientos, posee un grado de correlación entre la eficiencia alimenticia en los lechones destetados y transportados hacia la granja porcina.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio.

El estudio se llevó a cabo en el departamento de Ciencias Animales de la Universidad de Purdue, ubicada en la ciudad de West Lafayette, en el estado de Indiana, Estados Unidos, durante el periodo de enero-abril del 2018. La primera parte del estudio comprendió en la aplicación de tres tratamientos dietéticos: glutamina, antibióticos y no antibióticos, en la dieta de los lechones ubicados en la granja porcina en la Universidad de Purdue.

La segunda parte del estudio consistió en el análisis, a nivel molecular, de las muestras de heces colectadas de los lechones bajo los diferentes tratamientos. Esta actividad se llevó a cabo en el laboratorio de “Food Animal Microbiome” en el departamento de Ciencias Animales de la Universidad de Purdue. Seguido a este análisis, las muestras obtenidas se enviaron al departamento de Genómica ubicada en la Universidad de Purdue, para continuar con el proceso de secuenciación de las muestras.

Metodología.

La primera parte del estudio fue desarrollado y liderado por el Dr. Jay Johnson y su estudiante de doctorado Allan Duttlinger. En base a la información proporcionada por Allan Duttlinger, el experimento se realizó en dos temporadas: verano (julio 2016) y primavera (abril 2017) y en cada temporada se evaluaron 120 lechones.

El estudio se enfocó en analizar el efecto del estrés en el lechón provocado por el destete y transporte. Los lechones se destetaron a los 19 días de edad durante el verano 2016 y primavera 2017. Para simular el efecto del estrés provocado por el transporte cuando son movilizados de una granja a otra para proseguir con el proceso de engorde, los lechones destetados fueron transportados en tráiler por carreteras y caminos por aproximadamente 12 horas. El recorrido inició en la granja porcina de la Universidad de Purdue, West Lafayette, Indiana y culminó en la sección de guardería en la Universidad de Purdue. Esta actividad se realizó de la misma forma en cada temporada (verano, 2016 y primavera, 2017).

Luego de ser transportados en remolque, los lechones fueron divididos en 30 grupos, ocho lechones por corral; cada corral fue suplementado con un tratamiento dietético diferente. Esta división se realizó de la misma forma en cada temporada (Cuadro 1).

El diseño de este experimento se da de la siguiente forma:

Cuadro 1. Distribución de los lechones en corrales durante las temporadas de verano 2016 y primavera 2017 en la granja porcina de la Universidad de Purdue, Estados Unidos.

Temporada	Dieta	n	Días con el tratamiento
Verano	Antibióticos	10 corrales de 8 lechones	14
Verano	No Antibióticos	10 corrales de 8 lechones	14
Verano	Glutamina	10 corrales de 8 lechones	14
Primavera	Antibióticos	10 corrales de 8 lechones	14
Primavera	No Antibióticos	10 corrales de 8 lechones	14
Primavera	Glutamina	10 corrales de 8 lechones	14

Dietas.

El estudio utilizó tres tratamientos dietéticos que se suministraron a las dietas de lechones destetados durante 14 días. Luego de este periodo, se retiró cada uno de los tratamientos y los lechones se alimentaron con una dieta libre de antibióticos durante tres semanas, siguiendo el esquema nutricional para cada etapa de crecimiento utilizado en la granja porcina de la Universidad de Purdue (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición de los tratamientos dietéticos utilizados en las temporadas de verano 2016 y primavera 2017 en la granja porcina de la Universidad de Purdue, Estados Unidos.

Dieta	Compuesto
Antibióticos	Clortetraciclina (441 mg/kg) + Tiamulina (38.6 mg/kg)
No antibióticos	No antibióticos
Glutamina	L-Glutamina al 0.20%

Eficiencia alimenticia.

Para esta variable, se utilizó un cociente “Gain to Feed ratio, G:F” el cual indica la cantidad de alimento necesario que el animal debe recibir (Koch *et al.* 1963). Se estableció como unidad experimental cada corral y se midió el cociente de eficiencia alimenticia semanalmente, durante cinco semanas. Los datos de la eficiencia alimenticia se recolectaron durante el desarrollo de la primera etapa del estudio, con la ayuda del Dr. Jay Johnson y Allan Duttlinger.

Recolección de muestras de íleon de lechones.

Para el análisis molecular del estudio, se cosechó de cada corral un lechón al día 13 y 33 post-destete y transporte, obteniendo por cada temporada (verano 2016 y primavera 2017), un total de 60 muestras de íleon de lechón. Se colectó al final de las dos temporadas 120 muestras de íleon de lechones (Cuadro 3).

Cuadro 3. Recolección de muestras de íleon de lechón en la temporada de verano 2016 y primavera 2017, en la granja porcina de la Universidad de Purdue, Estados Unidos.

Tratamiento	Corrales	Lechones		Temporada
		cosechados	Día de cosecha	
Antibiótico	10	10	13 y 33	Verano y Primavera
Glutamina	10	10	13 y 33	Verano y Primavera
No Antibiótico	10	10	13 y 33	Verano y Primavera

Como parte del estudio, luego que los lechones se transportaron en remolque durante aproximadamente 12 horas, estos se cosecharon 24 horas post-transporte sin haber recibido ningún tratamiento. Esta actividad se realizó en ambas temporadas con el objetivo de extraer muestras de íleon de cuando el lechón se encuentra bajo el efecto directo del estrés ocasionado por el destete y transporte.

La recolección de muestra de íleon de lechones se realizó en ambas temporadas. Se cosechó seis lechones en la temporada de verano 2016, y seis lechones en la temporada de primavera 2017, para un total de 12 muestras de lechones transportados por 12 horas en camión.

Luego de recolectar cada una de las muestras, estas se almacenaron en un congelador -80°C para evitar que las bacterias continuaran creciendo, afectando en la composición microbiana de las mismas.

Extracción y cuantificación de ADN.

El ADN se extrajo de las muestras de íleon provenientes de los lechones utilizando el kit “Dneasy PowerLyzer PowerSoil” producido por la empresa Qiagen. Este protocolo utiliza como método de extracción de ADN una solución de detergente aniónico compuesto de sodio dodecil sulfato (SDS), el cual se encarga de romper los ácidos grasos y lípidos que se encuentran en la membrana celular de varios organismos, permitiendo la salida de la información genética (MoBio 2016).

Luego de la extracción, se almacenó las muestras a 4°C . Seguido a este paso, se cuantificó la concentración de ADN extraído para cada una de las muestras utilizando los equipos “Nanodrop 2000/2000c Spectrophotometers” y “Quibit 4 Flurometer”. Se utilizó dos equipos distintos para verificar si la lectura de la concentración medida era acertada y similar en ambos resultados y así evitar una lectura errónea que podría perjudicar los resultados al momento de ser enviados para la secuenciación.

Preparación de biblioteca del índice 16s.

Las muestras de ADN, por haber sido extraídas del íleon del lechón, no solamente presenta ADN de bacterias, sino que puede existir contaminación por otras fuentes de ADN. Para evitar esta problemática, el experimento se enfocó en la amplificación del gen 16s rRNA únicamente encontrado en bacterias, el cual es un gen que se encuentra muy conservado y de fácil amplificación por lo que permite una fácil detección de este tipo de microorganismos. Para la preparación del índice usando el gen 16S rRNA, se utilizó el protocolo de Kozich (2013) (16S Sequencing with the Illumina MiSeq Personal).

Preparación de muestras para PCR.

Las muestras de ADN luego de pasar por el proceso de cuantificación y en referencia al resultado obtenido, se diluyó su contenido 10 veces de la siguiente forma: 18 μL agua, 2 μL de ADN y se obtuvo un volumen final de 20 μL .

Preparación de cebadores.

El proceso de amplificación del gen 16s rRNA, requiere de cebadores específicos para dicha secuencia genética que permita que solo se amplifique la región genética deseada. Se utilizó las secuencias genéticas proporcionadas en el protocolo “16S Sequencing with the Illumina MiSeq Personal Sequencer” para el diseño de los cebadores, teniendo como resultado los cebadores sentido A501-A508 y los cebadores anti sentido B701-B712. Posterior a este paso, se diluyó cada uno de los cebadores 10 veces, tomando 90 μL de agua y 10 μL de los cebadores y se almacenó los platos a 4°C para su posterior uso.

PCR.

El objetivo del PCR se basa en la amplificación de un segmento específico de ADN, para este estudio, la amplificación se enfocó en el gen 16s rRNA. Se utilizó el equipo “Mastercycler” para realizar dicha actividad, con un total de 35 ciclos. Se utilizó el protocolo propuesto por Kozich (2013) y se ajustó de la siguiente manera:

- ◆ 35 ciclos total.
- ◆ Temperatura de inicio de desnaturalización 95°C por dos minutos.
- ◆ Temperatura de desnaturalización 95°C por 20 segundos.
- ◆ Temperatura de hibridación de cebadores 55°C por 15 segundos.
- ◆ Temperatura de elongación 72°C 5 minutos.
- ◆ Temperatura de elongación final 72°C por 10 minutos.
- ◆ Temperatura de enfriado de muestras 4°C.

Se utilizó una comunidad de bacterias conocida (Comunidad Mock) como el control positivo y agua como control negativo y así se logró verificar si el proceso de amplificación se realizó de forma correcta. La preparación de la reacción (20 μL volumen final) para PCR se realizó de la siguiente forma:

- ◆ Se agregaron 17 μL de “AccuPrime Pfs SuperMix” en un tubo “Eppendorf”
- ◆ Se agregaron 1 μL de cebador sentido
- ◆ Se agregó 1 μL de cebador anti sentido
- ◆ Se agregó 1 μL de muestra de ADN diluido 10 veces.
- ◆ Se mezcló la mezcla completa usando el vórtex por cinco segundos.

Elaboración del gel de electroforesis.

El producto obtenido del método de PCR, se evaluó por medio de la elaboración de un gel de electroforesis. Para el desarrollo de esta etapa, se seleccionó ocho muestras del plato de PCR, más los controles positivo y negativo para corroborar si la amplificación del gen 16S rRNA fue exitoso. El gel se corrió por 45 minutos. La preparación del gel se preparó de la siguiente forma:

- ◆ Se tomaron 60 mL de agua “TAE” (Tris acetato y EDTA) 1X y se vertió en frasco de vidrio.
- ◆ Se pesó 0.5 gr de Agarosa al 1% y se mezcló con agua “TAE” en el frasco de vidrio.

- ◆ Se colocó en el microondas por un minuto con el objetivo de que toda la Agarosa de diluyera completamente en el agua.
- ◆ Se dejó enfriar el contenido a temperatura ambiente.
- ◆ Se agregaron 6 μL de “SYBR Green”, sustancia que se adhiere a las cadenas de ADN y facilita su observación.

Las muestras del producto de PCR más los controles positivo y negativo se prepararon, antes de colocarlas en el gel, de la siguiente forma:

- ◆ Se colocaron 4 μL “loading dye” en una tira de cinta de plástico.
- ◆ Se tomaron 2 μL ADN (producto de PCR) y se mezcló con el “loading dye” pipeteando veces.
- ◆ Se mezclaron 4 μL “loading dye” y un μL escalera para PCR, el cual sirvió de referencia para conocer el número de pares de base y concentración de las muestras al finalizar el corrido del gel.

Normalización del producto del PCR.

La concentración de ADN representa un aspecto importante al momento de enviar las muestras a secuenciar, por lo que se normalizó la concentración de cada una de las muestras a una misma cantidad para evitar que un fragmento de ADN, por su mayor concentración, tenga mayor secuenciación que un fragmento de ADN con menor concentración. Para este procedimiento, se utilizó el “SequalPrep Normalization Kit” y el protocolo “Illumina MISep Personal Sequencer” (Kozich 2013).

Para la realización de este paso, se modificó el volumen a usar establecido:

- a) Fijación de ADN
 - ◆ Se transfirieron 8 μL (en el protocolo establece utilizar 18 μL) de cada producto obtenido en el PCR a un plato de 96 muestras, provisto en el kit.
 - ◆ Se agregaron 8 μL (en el protocolo establece utilizar 18 μL) de búfer de enlace, este búfer permitirá que el ADN se adhiera a las paredes del tubo. Seguido a esto, se mezcló usando el vórtex por 10 segundos y se centrifugó por 30 segundos.
 - ◆ Se incubó el plato a temperatura ambiente por 60 minutos.
- b) Lavado de ADN
 - ◆ Se retiró todo el contenido de los tubos, evitando roce las paredes del mismo con las pipetas.
 - ◆ Se agregaron 50 μL de búfer de lavado, se mezcló y aspiró nuevamente para remover todo residuo del búfer en el tubo.
- c) Elución
 - ◆ Se agregaron 20 μL de búfer de elución y se mezcló evitando la formación de burbujas.
 - ◆ Se incubó el plato por cinco minutos a temperatura ambiente.
- d) Coctel de muestras para secuenciación
 - ◆ Para mezclado las muestras, se tomaron 5 μL de cada una de ellas y se colocó en un solo tubo.
 - ◆ El volumen restante, se refrigeró a 4°C para su posterior uso.

Control de la calidad del Biblioteca de índice 16s.

El control de calidad del coctel de muestras obtenido del proceso de normalización es un factor importante en el protocolo debido a que permite conocer si la cantidad de ADN presente es necesaria para la secuenciación. Para el desarrollo de este paso, se utilizó el protocolo de “Illumina MISEq Personal Sequencer” elaborado por Kozich (2013).

a) “Agilent BioAnalyzer Trace”

Para esta etapa, se envió el producto obtenido del PCR al departamento de Genómica en la Universidad de Purdue.

b) Cuantificación de la librería “Kapa Q-PCR”

Se utilizó el “KAPA SYBR@ FAST Q-PCR Master Mix” para la preparación de la reacción del Q-PCR y se siguió el protocolo “Illumina MISEq Personal Sequencer”.

Con los datos obtenidos de cada análisis, se comparó los resultados y se verificó si el fragmento amplificado del gen 16s rRNA mostró la longitud deseada para su posterior secuenciación.

Secuenciación de la biblioteca 16s.

Luego de haber hecho un control de calidad de la biblioteca de los índices 16s, el coctel preparado se envió al departamento de Genómica en la Universidad de Purdue para secuenciación. Los cebadores utilizados en la etapa de amplificación (PCR), poseen un código de barra el cual es único para cada muestra de ADN. Esto permitió facilitar la identificación taxonómica del ADN bacteriano de cada muestra, de acuerdo a la secuencia genética encontrada al momento de hacer el análisis estadístico.

Análisis de ADN.

El resultado obtenido de la secuenciación, se introdujo al programa estadístico “Mothur”, el cual comparó las secuencias genéticas encontradas en las muestras con una base de datos de la secuencia genética de cada bacteria que ha sido descrita. Esto permitió conocer la composición bacteriana que se encuentra en cada muestra. Con los documentos generados en “Mothur”, toda la información se introdujo en otro programa estadístico llamado “R Studio” versión 1.1.442, donde se analizó y graficó el resultado de cada uno de los análisis desarrollados.

Variables medidas

Las variables analizadas se obtuvieron tomando los documentos generados sobre el análisis de la composición bacteriana en las muestras del íleon de los lechones usando los programas estadísticos “Mothur” y “R Studio”; las variables medidas fueron:

Tabla OTU (Unidad taxonómica operativa).

La Unidad Taxonómica Operativa se refiere a la unidad de objeto de estudio, en la cual se agrupa las secuencias genéticas obtenidas de las muestras de ADN analizadas, que poseen 97% de similitud entre ellas (Stackebrandt 2001). Para esta investigación, se asume que cada OTU encontrada indica la presencia de un género específico de bacteria en la muestra y este grupo está compuesto por más de una secuencia genética analizada.

El análisis de las OTU tomará en cuenta el valor F calculado, el cual permite conocer el valor estimado de la variancia poblacional que existe entre las medias de los grupos evaluados. Para este cálculo se toma en cuenta la diversidad alfa, beta, la riqueza y abundancia de cada muestra. Cuando el número obtenido de F es mayor, esto indica que las medias muestrales de los grupos son diferentes, por lo tanto, hay mayor grado de variancia (Pardo 2000).

Con la información obtenida de la secuenciación, se realizó un gráfico de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS). Este grafico permite conocer la distancia o forma de agrupamiento de las muestras, dentro de un plano, en base a las coordenadas proporcionadas por el software estadístico “Mothur” (Holland 2008). Los puntos que se observaron en el gráfico representa cada una de las muestras evaluadas.

Este gráfico se elaboró usando la información de la tabla OTU, obtenida mediante la aplicación del método de Bray-Curtis. El objetivo de este grafico es visualizar los cambios en la comunidad bacteriana a través del tiempo. Se aplicó el método Bray-Curtis, debido a que permite cuantificar la diferencia o distancia en una matriz, entre cada una de las muestras (Sommerfield 2008) .

Para conocer el número de OTU en las muestras y la forma de como de distribuyen las secuencias genéticas que conforman cada OTU, se estableció un número estándar de secuencias genéticas a analizar para cada muestra, en este caso, 4,890 secuencias genéticas pertenecientes a bacterias. Este paso se realizó debido a que, en el proceso de análisis, se observó una alta variabilidad en el número de secuencias genéticas obtenidas en cada muestra, lo cual podría afectar el resultado final del análisis porque el programa podría incluir más secuencias genéticas de una sola muestra y dejando a un lado las muestras con menor cantidad de secuencias genéticas.

Población alfa.

La población alfa forma parte de los componentes entre los cuales la diversidad taxonómica global puede ser dividida. La composición de esta población puede ser dividida en dos grupos de acuerdo a su riqueza y abundancia. La riqueza de la población alfa se basa en el número de especies que se encuentran en una comunidad o muestra, mientras que la abundancia, se basa en la medida de la distribución de la abundancia relativa de cada una de las especies encontradas en la comunidad o muestra (Olszewski 2004).

Análisis estadístico.

Luego de obtener la tabla OTU y la tabla de la población alfa, se prosiguió con los análisis estadísticos con el objetivo de conocer la composición bacteriana presente en las muestras de íleon de lechón y determinar si existe cambio significativo en dicha comunidad entre cada tratamiento (glutamina, antibiótico y no antibiótico), los análisis estadísticos fueron:

Test PERMANOVA.

El test permite conocer la diferencia composición bacteriana en las muestras de íleon de lechón entre cada tratamiento, utilizando una probabilidad de $q < 0.1$, utilizando el método de Tasa de Descubrimientos Falsos (FDR). Este análisis se caracteriza por ser menos

conservativo en la corrección de comparaciones múltiples que el utilizado tradicionalmente. Al tener mayor número de pruebas múltiples, aumenta la probabilidad de cometer el error Tipo 1, por lo que permitió controlar la proporción de pruebas tomadas como nulas (error Tipo 1) (Correa 2010).

Test ANOVA.

Este test permitió conocer la población alfa, indicando la riqueza y abundancia en cada OTU (Unidad Taxonómica Operativa) en cada tratamiento, utilizando una probabilidad de $P < 0.05$. Para el análisis de la riqueza de la población alfa, se hará uso del método estadístico Chao el cual se encarga de estimar el número de especies que hay en la muestra, para este experimento, se enfocó el análisis a nivel de Género (Gotelli y Chao 2013).

Para el análisis de la abundancia, se utilizó el método estadístico Shannon, que indica el promedio del grado de incertidumbre que existe en la determinación a que grupo o especie pertenecerá el individuo (bacteria en este caso) cuando es escogido al azar dentro de la muestra (Pla 2006).

Test Metastats.

Esta es una prueba t, no paramétrica para comunidades microbianas, utilizando una conexión de pruebas múltiples y el método de Tasa de descubrimiento falsa, con una probabilidad de $q < 0.1$ y permitió conocer la diferencia que existe en las OTU evaluadas a nivel taxonómico, específicamente a nivel de Género. Con la información obtenida, se sumó los promedios de abundancia y se filtró usando un rango mayor a 0.001, en cada una de las comparaciones entre tratamientos y días y se filtró usando una probabilidad de $q < 0.1$. Esto permitió obtener aquellas OTU que fueron relativamente abundantes y estadísticamente diferentes en los tratamientos.

Test de Correlación.

Se aplicó el método de Spearman con el objetivo de determinar la correlación que existe entre los datos de eficiencia alimenticia obtenidos en la investigación del Dr. Jay Johnson y los datos obtenidos de las composiciones microbianas encontradas en cada tratamiento, utilizando una probabilidad de $q < 0.1$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Visualización del patrón de agrupamiento de las muestras de íleon.

Con los resultados obtenidos del método Bray-Curtis y el gráfico NMDS, se observó que en la temporada de verano 2016, las muestras pertenecientes a los tratamientos con antibióticos y glutamina, presentaron un patrón similar de agrupamiento en los días 13 y 33 (Figura 1), por lo que puede indicar una similitud en la composición bacteriana. Mientras que el grupo control presentó una alta dispersión, sin patrón de agrupamiento entre las muestras (Figura 1) a través del tiempo indicando una mayor variabilidad en las composiciones bacterianas a través del tiempo.

En la temporada de primavera 2017, las muestras tratadas con glutamina a través del tiempo, presentaron un patrón similar de agrupamiento y poca distancia entre las mismas, en el día 13 y 33 (Figura 1), indicando una similitud en la composición bacteriana de las muestras. Sin embargo, en las muestras pertenecientes al grupo control y antibióticos, se observó una mayor dispersión y sin patrón de agrupamiento claro, en los días 13 y 33 (Figura 1), indicando que también existe una variabilidad en la composición.

En un estudio realizado por Isaacson y Kim (2012), se demostró que la composición microbiana del intestino en los animales sin haber sido sometidos a un tratamiento, tiende a cambiar y variar en la época del crecimiento y desarrollo del lechón y se le denomina como sucesión microbiana. Este fenómeno ocurre con mayor frecuencia desde el nacimiento hasta el destete, mostrando un aumento en la riqueza y abundancia de la composición bacteriana. Posteriormente continua en aumento en los días 21 al 42 post-destete del lechón (Riis 2016). Así mismo, la sucesión microbiana puede ser afectado por del ambiente donde se encuentre y de la edad del lechón (Konstantinov *et al.* 2004)

La presencia de glutamina también puede afectar la composición bacteriana. En el estudio de Yang (2014), demostró que el 40% de la composición bacteriana presente en el íleon de los lechones prefiere el uso de glutamina para promover su crecimiento, indicando la razón por la cual el comportamiento similar de las muestras bajo este tratamiento a través del tiempo.

Loof (2014) en su investigación sobre el uso de antibióticos argumentó que la riqueza y abundancia de las composiciones bacterianas del intestino, específicamente en el íleon, se reducen bajo la presencia de antibióticos, por ende, existe una disminución en la composición bacteriana. Esta reducción es provocada por la habilidad que tiene dichos compuestos de eliminar bacterias benéficas o patógenas reduciendo su población (Hardy 2002).

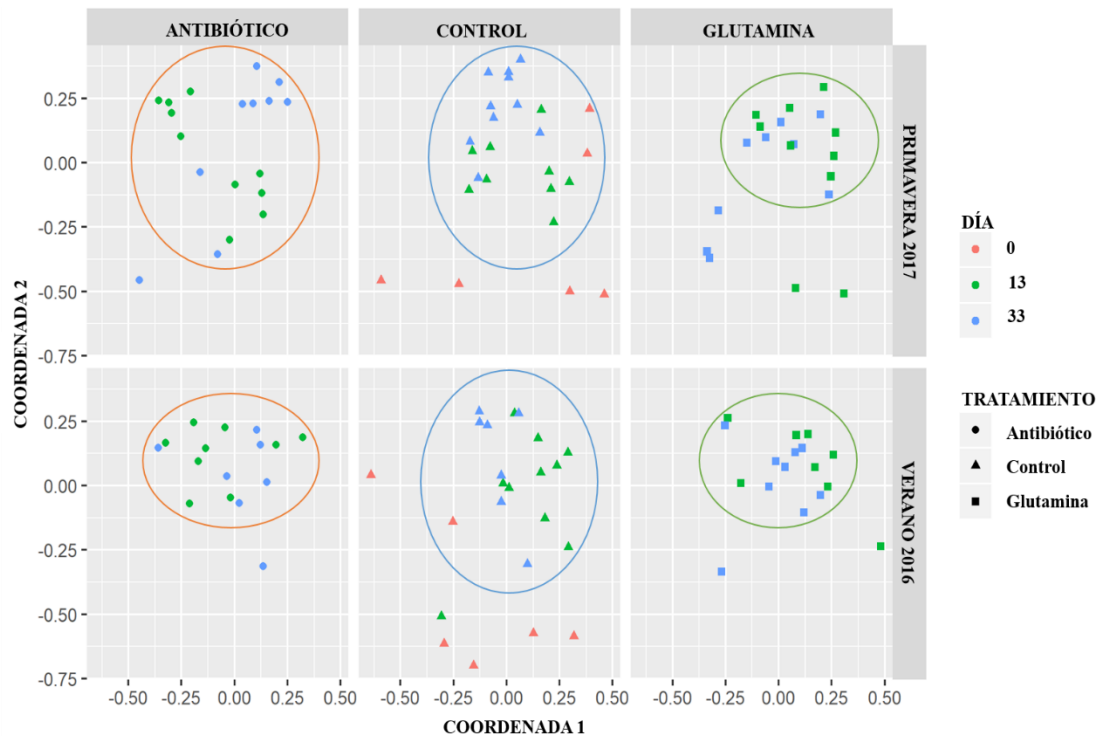


Figura 1. Gráfico NMSD, utilizando el método Bray-Curtis donde se observa la distancia y patrones de agrupamiento de las muestras presentes en los tratamientos antibiótico, control y glutamina, en las temporadas de verano 2016 y primavera 2017.

Análisis de número de OTUs, verano 2016.

Para este estudio, se analizó el número aproximado de OTU encontrados en cada tratamiento. Al observar los resultados del análisis PERMANOVA sobre la composición de las OTU a través del tiempo, se observó el número aproximado de OTU pertenecientes al grupo control, es significativamente diferente ($q < 0.1$) en los días 0-13, 0-33 y 13-33 (Cuadro 4).

El valor F calculado permite conocer el valor estimado de variación que existe entre las medias de las muestras. Para esta temporada se observó que aquellas muestras pertenecientes al grupo control que son significativamente diferentes, posee un valor F mayor que uno, indicando una alta variabilidad en las medias de las muestras evaluadas (Cuadro 4).

Mientras que el número de OTU para los tratamientos con antibióticos y glutamina, en los días 13 y 33, no son significativamente distintos ($q > 0.1$) (Cuadro 4) y se asume que no existió una variación en el número de bacterias encontradas en los tratamientos. Así mismo se observó que el valor F calculado para estos tratamientos un poco mayor a uno, por lo que la variabilidad en las muestras es menor.

Un estudio realizado por Ren *et al.* (2014) en ratones, evidenció el mismo comportamiento en la composición bacteriana del íleon, donde la población bacteriana, bajo el efecto de glutamina, fue menor que la población bacteriana sin tratamiento. La presencia de

glutamina en el medio, genera un cambio en el metabolismo de las bacterias para obtener dichos compuestos, como aminoácidos y asimilación de nitrógeno, lo que provoca un cambio en la actividad y número de cierto microorganismos presentes en el íleon (Forchhammer 2007; Dai *et al.* 2013).

En el segundo análisis, diferente tratamiento y mismo día, se observó que el número de OTU de cada muestra, no presentó diferencia significativa ($q > 0.1$) (Cuadro 5) entre los tres tratamientos evaluados. Por lo tanto, no se evidenció un cambio significativo en la composición o número de bacterias en las muestras bajo los tres tratamientos. No obstante, el valor F para la comparación A vs C y A vs GLN, presentan una alta variación en las medias de las muestras evaluadas, aunque estadísticamente no son diferentes ($q > 0.1$).

Este efecto en la no variación de la composición bacteriana en las muestras con glutamina puede estar relacionado con la forma de cómo afecta en los procesos de metabolización productos necesarios para el crecimiento de las bacterias (Forchhammer 2007; Dai *et al.* 2013).

La no variación en la población bacteriana del íleon bajo el tratamiento con antibióticos se debe a que puede existir una reducción en la composición bacteriana en el intestino (Butaye *et al.* 2003). Estos compuestos pueden inhibir el crecimiento mediante la modificación del proceso metabólico de carbohidratos y proteínas, destrucción de la membrana celular e interrumpir con el proceso de síntesis de ácidos nucleicos (Hardy 2002; Gresse *et al.* 2017).

Cuadro 4. Comparación de OTU presente en los días 0, 13 y 33 post-destete, bajo el efecto de los tratamientos dietéticos, durante la temporada de verano 2016.

TRT/ Día	Número de OTUs			PERMANOVA			
	A	C	GLN	Comp	TRT	Valor F	Valor q
Día 0		836.782 [¥]		13 vs 33	A	1.07 [£]	0.476
Día 13	773.89 [¥]	870.536 [¥]	680.954 [¥]	0 vs 13	C	3.36 [£]	0.045*
Día 33	589.50 [¥]	757.225 [¥]	745.362 [¥]	0 vs 33	C	2.12 [£]	0.045*
				13 vs 33	C	4.27 [£]	0.028*
				13 vs 33	GLN	1.60 [£]	0.140

A=Antibiótico, GLN=Glutamina, C=Control, TRT=Tratamiento, Comp=Comparación.

[¥]Sumatoria de las OTU en cada tratamiento.

[£]Estimado de cuan diferente son las medias de las muestras analizadas.

*Probabilidad ($q \leq 0.1$) en la comparación de las OTU en cada tratamiento.

Cuadro 5. Comparación de OTU presentes en los tres tratamientos dietéticos al día 13 y 33 post-destete y transporte durante la temporada de verano 2016.

Número de OTUs			PERMANOVA			
Día/TRT	D13	D33	Comp	Día	Valor F	Valor q
Antibiótico	773.89 [¥]	589.51 [¥]	A vs C	13	1.33 [£]	0.350
Control	870.54 [¥]	757.23 [¥]	A vs GLN	13	1.40 [£]	0.351
Glutamina	680.95 [¥]	745.36 [¥]	C vs GLN	13	1.32 [£]	0.350
			A vs C	33	2.24 [£]	0.116
			A vs GLN	33	2.83 [£]	0.117
			C vs GLN	33	1.19 [£]	0.380

A=Antibiótico, GLN=Glutamina, C=Control, TRT=Tratamiento, Comp=Comparación.

Valor q= $q < 0.1$

[¥]Sumatoria de las OTU en cada tratamiento.

[£]Estimado de cuan diferente son las medias de las muestras analizadas.

Análisis de la composición de OTUs, primavera 2017.

Se realizó el mismo procedimiento que en la temporada de verano 2016. Según los resultados de análisis PERMANOVA, no se observó diferencia significativa en el número de OTU (>0.1) encontrados en las muestras bajo el efecto de los tratamientos comparándolos el mismo día (Cuadro 6). Esto indica que no hubo variación en la composición bacteriana en los tratamientos. No obstante, el valor F calculado mostró una alta variabilidad en la media de las muestras de A vs GLN y A vs C, aunque no fueron estadísticamente diferentes ($q > 0.1$).

Mientras que, en la misma temporada, se evidenció que en las muestras pertenecientes al grupo control, existió una diferencia significativa ($q < 0.1$) en el número de OTU en las muestras a través del tiempo. Esto indicó que en los días 0, 13 y 33 hubo variación en el número de bacterias en las muestras ($q < 0.1$) (Cuadro 7). El valor F calculado para estos días fue mayor que uno, indicando que las composiciones bacterianas en los días evaluados son diferentes.

El efecto de antibiótico y glutamina que produjo la no variación en la composición de las OTU en las muestras, puede estar relacionado con cambios en el metabolismo como resultado de la forma de absorción de nutrientes, aminoácidos y compuestos importantes para el crecimiento de las bacterias, generando una disminución en la población. (Forchhammer 2007; Gresse *et al.* 2017).

La variación en el número de bacterias (composición bacteriana de OTU) en la muestra sin tratamiento a través del tiempo, puede ser el resultado del efecto de la sucesión microbiana (Riis 2016) del lechón después de ser destetado.

Cuadro 6. Comparación de OTU presentes en los tres tratamientos dietéticos al día 13 y 33 post-destete y transporte durante la temporada de primavera 2017.

Número de OTUs			PERMANOVA			
Día/TRT	D13	D33	Comp	Día	Valor F	Valor q
Antibiótico	941.38 [¥]	621.78 [¥]	A vs C	13	1.15 [£]	0.38
Control	1055.13 [¥]	701.42 [¥]	A vs GLN	13	1.04 [£]	0.39
Glutamina	1176.68 [¥]	729.60 [¥]	C vs GLN	13	1.08 [£]	0.38
			A vs C	33	3.43 [£]	0.12
			A vs GLN	33	2.15 [£]	0.24
			C vs GLN	33	1.38 [£]	0.35

A=Antibiótico, GLN=Glutamina, C=Control, Comp=Comparación, TRT=Tratamiento
Valor q= q<0.1

[¥]Sumatoria de las OTU en cada tratamiento.

[£]Estimado de cuan diferente son las medias de las muestras analizadas.

Cuadro 7. Comparación de OTU presentes en los días 0, 13 y 33 post-destete, bajo el efecto de los tratamientos dietéticos, durante la temporada de primavera 2017.

Número de OTUs				PERMANOVA			
TRT/ Día	A	C	GLN	Comp	TRT	Valor F	Valor q
Día 0		637.69 [¥]		13 vs 33	A	1.81 [£]	0.140
Día 13	941.37 [¥]	941.78 [¥]	1,176.68 [¥]	0 vs 13	C	2.45 [£]	0.045*
Día 33	621.78 [¥]	621.78 [¥]	729.60 [¥]	0 vs 33	C	2.44 [£]	0.045*
				13 vs 33	C	0.60 [£]	0.816
				13 vs 33	GLN	0.90 [£]	0.528

A=Antibiótico, GLN=Glutamina, C=Control, TRT=Tratamiento, Comp=Comparación.

[¥]Sumatoria de las OTU en cada tratamiento.

[£]Estimado de cuan diferente son las medias de las muestras analizadas.

*Probabilidad (q≤0.1) en la comparación de las OTU en cada tratamiento.

Población alfa verano 2016.

Análisis de la riqueza.

Para este análisis, se utilizaron las 4,890 secuencias genéticas estandarizadas para cada muestra y se asumió que cada secuencia representa una bacteria. Posteriormente, se realizó el análisis de riqueza de la población, el cual indicó la diversidad de especies de bacterias encontrados en las muestras.

El análisis de la riqueza utilizando el método Chao no presentó diferencia significativa (P>0.05) en la diversidad de bacterias entre los tratamientos y días evaluados en la temporada de verano 2016 (Cuadro 8).

Este efecto puede estar relacionado a que la presencia de antibiótico y glutamina en las muestras. Estos afectan la composición bacteriana en el intestino, ya sea por control directo sobre microorganismo patógenos o modificando el metabolismo de obtención de nutrientes necesarios para su crecimiento (Hardy 2002; Dai *et al.* 2013). Esto puede indicar la razón de la disminución en el número de especies en la muestra o una variación no estadísticamente representativa en las muestras.

Cuadro 8. Análisis de la riqueza de la composición bacteriana presente en la población alfa entre tratamiento y días en la temporada del verano 2016.

Día/Tratamiento	Control	Glutamina	Antibiótico
0	139.463 [¥]		
13	87.053 [¥]	85.119 [¥]	85.989 [¥]
33	108.175 [¥]	82.818 [¥]	84.215 [¥]
Variable	Valor P		
Tratamiento	0.113		
Día	0.064		

Valor p= Probabilidad (P<0.05)

[¥]Promedio del valor estimado del número especies de bacterias en el tratamiento.

Análisis de la abundancia.

Para este análisis, se utilizó las 4,890 secuencias genéticas estandarizadas para cada muestra y se asumió que cada secuencia genética representa una bacteria. Al analizar la abundancia relativa o cantidad de especies encontradas en la población alfa, utilizando el método Shannon, se observó una diferencia significativa (P<0.05) en la abundancia relativa de bacterias pertenecientes a una especie entre los días evaluados en la temporada de verano 2016 (Cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de la abundancia relativa de la composición bacteriana presente en la población alfa entre tratamiento y días en la temporada del verano 2016.

Día/Tratamiento	Control	Glutamina	Antibiótico
0	2.755 [¥]		
13	2.427 [¥]	2.393 [¥]	2.297 [¥]
33	2.012 [¥]	2.270 [¥]	2.209 [¥]
Variable	Valor P		
Tratamiento	0.717		
Día	0.035*		

*Probabilidad (P<0.05).

[¥]Promedio de la abundancia relativa de bacterias pertenecientes a una especie en los tratamientos.

Para conocer la comparación en la cual se mostró un cambio en la abundancia relativa de dichas bacterias, se aplicó el método de Tukey. Se observó una tendencia a ser diferente, estadísticamente significativa ($P=0.055$) entre los días 0 y 33 en la temporada de verano 2016 (Cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis de Tukey sobre la abundancia relativa de la composición bacteriana presente en la población alfa entre tratamiento y días en la temporada del verano 2016.

Abundancia		Análisis de Tukey	
Tratamiento	Índice Shannon	Comparación	Valor P
Control	2.253 [¥]	A-Control	0.694
Glutamina	2.331 [¥]	GLN-Control	0.924
Antibiótico	2.399 [¥]	GLN-A	0.910
Día			
0	2.755 [¥]	13-0	0.306
13	2.372 [¥]	33-0	0.055*
33	2.164 [¥]	33-13	0.317

A=Antibiótico, GLN=Glutamina

*Probabilidad ($P<0.05$)

[¥]Promedio de la abundancia relativa de bacterias pertenecientes a una especie en el tratamiento.

El cambio en la abundancia del número de bacterias que pertenecen a una especie dentro de la misma muestra, en los días 0-33, puede estar ligado con la sucesión microbiana que ocurre a través del tiempo y que es afectado por el ambiente en el que se encuentra el lechón y la edad del mismo (Riis 2016). Además, esta sucesión puede ser afectado por cambios en la dieta, estrés ocasionado por el destete u otros factores fisiológicos (Pajarillo *et al.* 2014).

Población alfa primavera 2017.

Análisis de la riqueza.

Hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) utilizando el método Chao en la riqueza de las especies presentes en la población alfa de la temporada primavera 2017 entre los días evaluados (Cuadro 11).

Cuadro 11. Análisis de la riqueza en el número de especies bacterianas presente en la población alfa entre tratamiento y días en la temporada de primavera 2017.

Día/Tratamiento	Control	Glutamina	Antibiótico
0	106.281 [¥]		
13	117.236 [¥]	117.667 [¥]	94.137 [¥]
33	70.142 [¥]	81.066 [¥]	69.087 [¥]
Variable	Valor P		
Tratamiento	0.292		
Día	0.002*		

*Probabilidad ($P < 0.05$)

[¥]Promedio del valor estimado del número especies de bacterias en el tratamiento.

Por medio de la aplicación del método de Tukey, se determinó que la diferencia significativa ($P < 0.05$) se encuentra entre los días 13 y 33 (Cuadro 12).

Cuadro 12. Análisis de Tukey sobre riqueza en el número de especies bacterianas presente en la población alfa entre tratamiento y días en la temporada de primavera 2017.

Riqueza		Análisis de Tukey	
Tratamiento	Índice Chao	Comparación	Valor P
Control	97.887 [¥]	A-Control	0.454
Glutamina	99.367 [¥]	GLN-Control	0.913
Antibiótico	81.611 [¥]	GLN-A	0.292
Día			
0	106.281 [¥]	13-0	0.925
13	109.680 [¥]	33-0	0.172
33	73.431 [¥]	33-13	0.001*

A= Antibiótico, GLN= Glutamina

*Probabilidad ($P < 0.05$)

[¥]Promedio del valor estimado del número especies de bacterias en el tratamiento.

En los días 13 y 33, el cambio en el número de especies encontradas en las muestras puede estar influenciado por el efecto de la sucesión microbiana (Riis 2016) o por el mismo el mismo resultado obtenido de la riqueza en la temporada de verano 2016 (Cuadro 9), el cual

indicó una disminución, en este caso, una diferencia estadísticamente representativa ($P < 0.05$) en la riqueza de la población alfa en muestras con los tratamientos dietéticos con glutamina y antibióticos.

Abundancia de la Población alfa primavera 2017.

Al analizar la abundancia relativa del número de bacterias pertenecientes a una especie, utilizando el método Shannon, se observó que existe una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamiento y días evaluados (Gráfico 13).

Por medio del método de Tukey, se observó que la diferencia significativa en la abundancia relativa del número de bacterias se da entre glutamina y antibiótico en los días 13 y 33, indicando una disminución en el número de bacterias pertenecientes a una especie en los tratamientos (Gráfico 14), mismo resultado obtenido del análisis de la riqueza. Este patrón muestra que con la disminución en el número de bacterias (riqueza) en el día 13-33, también existió una reducción en la abundancia relativa en las muestras.

Cuadro 13. Análisis de la abundancia relativa de la composición bacteriana presente en la población alfa entre tratamiento y días en la temporada de primavera 2017.

Día/Tratamiento	Control	Glutamina	Antibiótico
0	2.054 [¥]		
13	2.645 [¥]	2.724 [¥]	2.268 [¥]
33	1.915 [¥]	1.978 [¥]	1.599 [¥]
Variable	Valor P		
Tratamiento	0.039*		
Día	5.760E-06*		

*Probabilidad ($P < 0.05$).

[¥]Promedio de la abundancia relativa de bacterias pertenecientes a una especie.

Cuadro 14. Análisis de Tukey sobre la abundancia composición bacteriana presente en la población alfa entre tratamiento y días en la temporada de primavera 2017.

Abundancia		Análisis de Tukey	
Tratamiento	Índice Shannon	Comparación	Valor P
Control	2.205 [¥]	A-Control	0.215
Glutamina	2.351 [¥]	GLN-Control	0.549
Antibiótico	1.934 [¥]	GLN-A	0.032*
Día			
0	2.054 [¥]	13-0	0.059
13	2.546 [¥]	33-0	0.679
33	1.830 [¥]	33-13	4.23E-06*

A= Antibiótico, GLN= Glutamina.

*Probabilidad (P<0.05)

[¥]Promedio de la abundancia relativa de bacterias pertenecientes a una especie.

Se puede relacionar el cambio significativo en la composición bacteriana bajo el efecto de la glutamina y antibióticos por la disminución en la carga microbiana que pueden provocar estos compuesto como resultado del cambio en los procesos metabólicos para obtención de nutrientes (Hardy 2002; Dai *et al.* 2013).

Análisis taxonómico a nivel de Género.

Se analizó los resultados de los cambios en la riqueza y abundancia de la población alfa. Se utilizó el test de Metastats con el objetivo de indicar la diferencia significativa ($q < 0.1$) en las OTU a nivel de Género encontradas en cada tratamiento.

Según lo observado en los resultados del análisis de OTU para ambas temporadas, se destacó aquellas 20 bacterias con mayor abundancia en las muestras bajo el efecto de los tres tratamientos en los tres días evaluados. Dentro de este grupo se observó que *Lactobacillus*, *Clostridium* sensu stricto y *Streptococcus*, fueron las bacterias donde hubo mayor variación en su abundancia a través del tiempo (Figura 2). Este mismo resultado fue encontrado en otra investigación donde se observó que estos tres géneros pertenecientes al grupo filogenético de Firmicutes, tiene mayor dominancia en el íleon de los lechones destetados (Dowd *et al.* 2008).

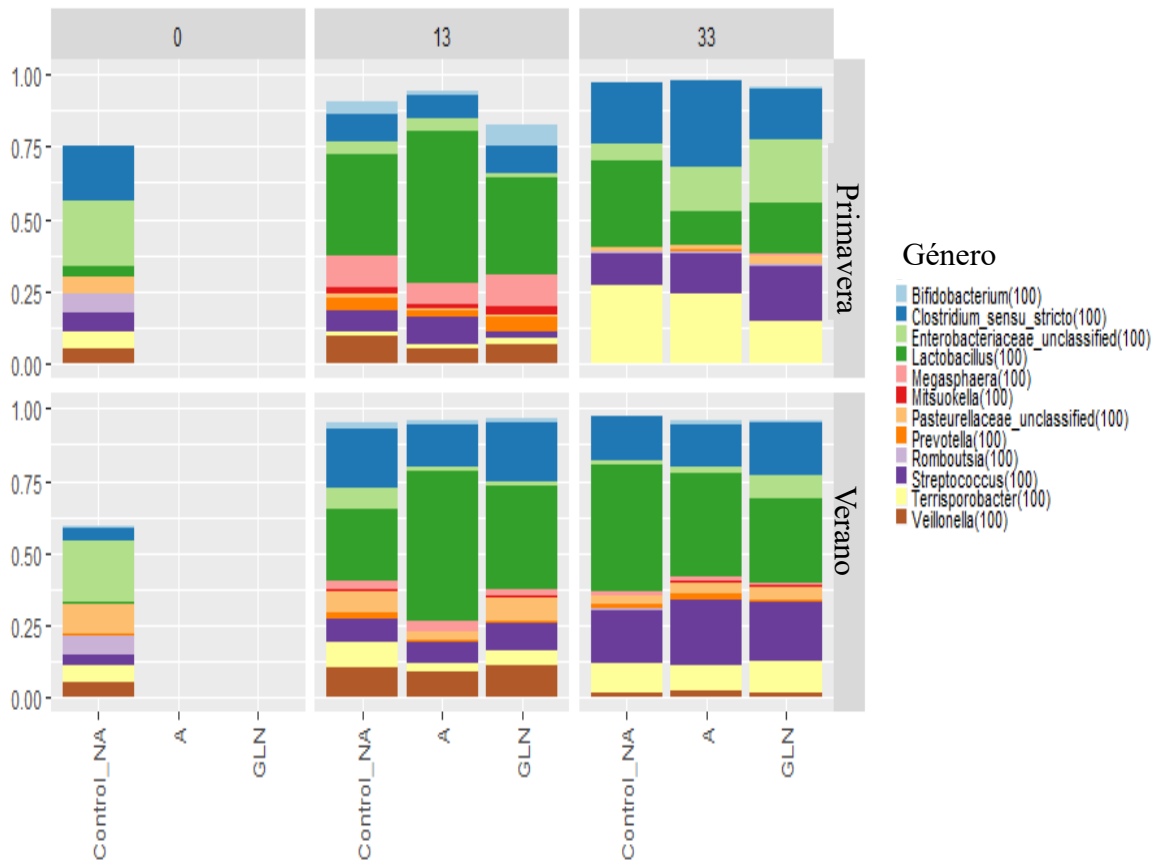


Figura 2. Comportamiento a través del tiempo de los 20 grupos de bacterias, a nivel de género, con mayor abundancia presentes los tratamientos con antibióticos, glutamina y control, evaluados en la temporada de primavera 2017 y verano 2016.

En la temporada de verano 2016 y primavera 2017, se observó un aumento en la abundancia de *Lactobacillus* (Figura 2, color verde oscuro) en las muestras bajo los tres tratamientos del día 0 al 13 pero una disminución del día 13 al 33. La presencia de esta bacteria post-destete, ayuda a reparar aspectos del aparato gastrointestinal de los lechones debido a sus efectos como probiótico, previniendo el desarrollo de otras infecciones bacterianas en esta etapa crítica del lechón (Pascual *et al.* 2008; Kim y Isaacson 2015; Li *et al.* 2017).

En ambas temporadas también se observó un incremento en la abundancia de *Clostridium sensu stricto* (Figura 2, color azul) del día 0 al 13 y para ambas temporadas se mantuvo estable del día 13 al 33 en los tres tratamientos. Este género, también conocido como *Clostridium*, se caracteriza por metabolizar carbohidratos, alcoholes, amino ácidos, purines, esteroides y posee propiedades nutricionales, por la presencia de ácido butírico, en las células del epitelio, evitando el efecto de organismo patógenos en el intestino (Vos *et al.* 2009; Meimandipour *et al.* 2010). Además, existe una especie en específico dentro de este grupo que puede ser utilizado como probiótico, conocida como *Clostridium butyricum*.

Dentro de los 20 grupos con mayor abundancia relativa a nivel de género, se observó para ambas temporadas un incremento de *Streptococcus* (Figura 2, color morado) del día 0 al 33,

en los tres tratamientos. Según Li *et al.* (2017), la presencia de esta bacteria forma parte de la bacteria comensal del intestino del animal.

Según lo observado, *Streptococcus* se convirtió en una de las bacterias dominantes post-destete por su aumento a través del tiempo, no obstante, su presencia es un potencial riesgo para la salud de la barrera intestinal del lechón (Su *et al.* 2008). El aumento de esta bacteria post-destete está ligado al pH bajo del estómago antes del destete, el cual controla la proliferación de bacterias potencialmente dañinas para el lechón (Su y Zhu 2006)

Se analizó los resultados obtenidos del test Metastats para conocer la diversidad bacteriana a nivel de género presente en las muestras evaluadas. Se sumó las medias que indican la cantidad de esta bacteria presente en la muestra y se filtró utilizando la probabilidad de $q < 0.1$ y una media arriba de 0.001. Esto se realizó con el objetivo de mostrar lo grupos de bacterias más abundantes y que son estadísticamente diferentes al transcurrir el tiempo.

Según Isaacson y Kim (2012), en su estudio demostraron que el intestino está compuesto en un 90% de bacterias pertenecientes al Filo: Firmicutes y Bacteroides. Mientras que la composición bacteriana del íleon, presentó por arriba del 40% la presencia de filo Proteobacteria, concordando con los resultados en el experimento (Cuadro 15 y 16).

Cuadro 15. Identificación taxonómica de OTU presentes en lechones sin tratamiento en la temporada de primavera 2017.

Día	Filo	Género [‡]
	Actinobacteria	<i>Bifidobacteria</i> y Coriobacteriaceae no clasificado
	Bacteroides	<i>Bacteroides</i>
	Protobacteria	<i>Helicobacter</i>
13-0	Firmicutes	<i>Lactobacillus</i> , <i>Blautia</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Romboutsia</i> , Lactobacillales no clasificado, <i>Acidaminococcus</i> y <i>Turicibacter</i> .
	Actinobacteria	<i>Olsenella</i> , <i>Bifidobacterium</i> y <i>Actinomyces</i>
	Bacteroides	<i>Prevotella</i> y Porphyromonadaceae no clasificada
33-13	Firmicutes	<i>Terrisporobacter</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Mitsoukella</i> , <i>Acidaminooccus</i> , <i>Sharpea</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Clostridium IV</i> , <i>Dialister</i> y <i>Romboutsia</i> .

[‡] Género bacteriano estadísticamente diferente en los días evaluados ($q < 0.1$) y con abundancia en la muestra mayor de 0.001.

Cuadro 16. Identificación taxonómica de OTU presentes en lechones sin tratamiento en la temporada de verano 2016.

Día	Filo	Género [¥]
	Actinobacteria	<i>Rothia</i> y <i>Bifidobacterium</i>
	Bacteroides	<i>Bactetoides</i>
	Fusobacteria	<i>Fusobacterium</i> y Leptotrichiaceae no clasificado
	Protobacteria	<i>Moraxella</i> y <i>Neisseria</i>
		<i>Lactobacillus</i> , <i>Clostridium</i> sensu stricto, <i>Blautia</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , Aerococcaceae no clasificado, Clostridiales no clasificados y <i>Phascolartobacterium</i> ,
13-0	Firmicutes	<i>Romboutsia</i> , Lacnospiraceae no clasificado
	Actinobacteria	<i>Olsenella</i> , <i>Bifidobacterium</i> y <i>Actinomyces</i>
	Bacteroides	<i>Prevotella</i> y Porphyromonadaceae no clasificada <i>Terrisporobacter</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Mitsoukella</i> , <i>Acidaminooccus</i> , <i>Sharpea</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Clostridium</i> IV,
33-13	Firmicutes	<i>Dialister</i> y <i>Romboutsia</i> .

[¥] Género bacteriano estadísticamente diferente en los días evaluados ($q < 0.1$) y con abundancia en la muestra mayor de 0.001.

En la temporada de primavera 2017, las muestras tratadas con antibiótico Clortetraciclina (441 mg/kg), se observó que los grupos filogenético Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria (Cuadro 17) mostraron mayor abundancia (>0.001) y diferencia estadística a través del tiempo ($q < 0.1$). Mientras que en la temporada de verano 2016, ningún género bacteriano fue estadísticamente diferente a través del tiempo ($q > 0.1$) ni mostró una abundancia en la muestra mayor a 0.001.

El antibiótico Clortetraciclina pertenece al grupo de los Antibióticos Promotores de Crecimiento (AGPs) y se caracterizan por afectar la población microbiana del intestino. El efecto de este compuesto se observa mayormente en el intestino delgado, específicamente en el íleon, lo cual provoca un cambio en la composición microbiana del íleon (Coiler *et al.* 2003; Rettedal *et al.* 2009).

Según Gresse *et al.* (2017), en su investigación, se observó que los lechones al ser destetados a las tres semanas y alimentados con una dieta base y 2.73 gr de Clortetraciclina, se manifestó una mayor presencia de bacterias pertenecientes al Filo Firmicutes, esto concuerda con los resultados obtenidos para este experimento donde predomina este grupo filogenético.

Cuadro 17. Identificación taxonómica de OTU presentes en lechones tratados con antibióticos en la temporada de primavera 2017.

Temporada	Día	Filo	Género [¥]
		Actinobacteria	<i>Kitasatospora</i> y <i>Bifidobacteria</i>
		Protobacteria	<i>Helicobacter</i>
			<i>Lactobacillus</i> , <i>Terrisporobacter</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Romboutsia</i> , <i>Shapea</i> , <i>Dialister</i> , <i>Clostridium</i> sensu stricto, Clostridiaceae no clasificado,
Primavera	33-13	Firmicutes	Veillonellaceae no clasificado y <i>Mitsuokella</i> .

[¥] Género bacteriano estadísticamente diferente en los días evaluados ($q < 0.1$) y con abundancia en la muestra mayor de 0.001.

Para la temporada de primavera 2017, se observó que el filo de Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria predominan mayormente en el leon bajo el tratamiento de glutamina (Cuadro 18), mostrando que son estadísticamente diferentes las composiciones al transcurrir el tiempo ($q < 0.1$). No obstante, en la temporada de verano 2016, el único filo con mayor abundancia y diferente estadísticamente fue Firmicutes. La glutamina es un metabolito de suma importancia para la fisiología de las bacterias, debido a que su disponibilidad está relacionada con la respuesta celular, en presencia de nitrógeno, de las bacterias (Isaacson y Kim 2012).

Además se observó la presencia del grupo filogenético de las Proteobacterias (Cuadro 18), han desarrollado un mecanismo diferente para utilizar la glutamina como un agente de monitoreo del estado de nitrógeno metabolizable (Forchhammer 2007).

Cuadro 18. Identificación taxonómica de OTU presentes en lechones tratados con Glutamina en ambas temporadas.

Temporada	Día	Filo	Género [¥]
		Actinobacteria	<i>Olsenella</i> y <i>Bifidobacterium</i> .
		Proteobacteria	Enterobacteriaceae no clasificada.
			<i>Streptococcus</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Mitsuokella</i> , <i>Dialister</i> , <i>Lachnospiracidae</i> , <i>Acidaminococcus</i> , <i>Romboutsia</i> , <i>Terrisporobacter</i> y <i>Veillonellaceae</i> .
Primavera	33-13	Firmicutes	
Verano	33-13	Firmicutes	<i>Veillonella</i> y <i>Romboutsia</i> .

[¥] Género bacteriano estadísticamente diferente en los días evaluados ($q < 0.1$) y con abundancia en la muestra mayor de 0.001.

Análisis de Eficiencia Alimenticia.

Se recolectaron datos de eficiencia alimenticia (“Gain to Feed Ratio”, G: F) de los lechones evaluados en la granja porcina ubicada en la Universidad de Purdue, West Lafayette,

Indiana, Estados Unidos (Cuadro 19). El resultado mostró que aquellos lechones que su G:F fue cercano a 1.00, lograron obtener mayor peso (lb) por una libra de alimento ingerido.

Cuadro 19. Resultados de eficiencia alimenticia de lechones bajo los tratamientos dietético y cosechados al día 13 y 33 post-destete, en las temporadas de verano 2016 y primavera 2017.

VERANO 2016				PRIMAVERA 2017			
ID	Día	Tratamiento	G:F	ID	Día	Tratamiento	G:F
1	13	Glutamina	0.65	61	13	Glutamina	0.63
2	13	Antibiótico	0.74	62	13	Antibiótico	0.90
3	13	Control	0.64	63	13	Control	0.61
4	13	Control	0.76	64	13	Control	0.77
5	13	Glutamina	0.70	65	13	Glutamina	0.81
6	13	Antibiótico	0.69	66	13	Antibiótico	0.81
7	13	Antibiótico	0.73	67	13	Antibiótico	0.89
9	13	Control	0.64	68	13	Glutamina	0.76
10	13	Control	0.65	69	13	Control	0.70
11	13	Antibiótico	0.64	70	13	Control	0.66
12	13	Glutamina	0.65	71	13	Antibiótico	0.78
13	13	Control	0.69	72	13	Glutamina	0.83
14	13	Glutamina	0.73	73	13	Control	0.77
15	13	Antibiótico	0.78	74	13	Glutamina	0.74
16	13	Glutamina	0.77	75	13	Antibiótico	0.84
17	13	Control	0.70	76	13	Glutamina	0.65
18	13	Antibiótico	0.79	78	13	Antibiótico	0.78
19	13	Antibiótico	0.79	79	13	Antibiótico	0.68
20	13	Control	0.71	80	13	Control	0.76
21	13	Glutamina	0.80	81	13	Glutamina	0.74
22	13	Control	0.71	82	13	Control	0.75
24	13	Glutamina	0.72	83	13	Antibiótico	0.65
25	13	Control	0.87	84	13	Glutamina	0.79
27	13	Antibiótico	0.82	85	13	Control	0.66
28	13	Antibiótico	0.63	86	13	Glutamina	0.67
29	13	Glutamina	0.74	87	13	Antibiótico	0.67
30	13	Control	0.79	88	13	Antibiótico	0.68
33	33	Control	0.69	89	13	Glutamina	0.75
35	33	Glutamina	0.74	90	13	Control	0.77
36	33	Antibiótico	0.76	91	33	Glutamina	0.77
37	33	Antibiótico	0.83	92	33	Antibiótico	0.51
38	33	Glutamina	0.61	93	33	Control	0.70

40	33 Control	0.70	94	33 Control	0.65
41	33 Antibiótico	0.68	95	33 Glutamina	0.72
42	33 Glutamina	0.79	97	33 Antibiótico	0.63
44	33 Glutamina	0.61	98	33 Glutamina	0.67
46	33 Glutamina	0.62	99	33 Control	0.77
47	33 Control	0.66	100	33 Control	0.72
48	33 Antibiótico	0.72	101	33 Antibiótico	0.64
49	33 Antibiótico	0.70	102	33 Glutamina	0.71
50	33 Control	0.72	103	33 Control	0.79
51	33 Glutamina	0.67	104	33 Glutamina	0.75
52	33 Control	0.66	105	33 Antibiótico	0.68
53	33 Antibiótico	0.71	106	33 Glutamina	0.71
54	33 Glutamina	0.79	107	33 Control	0.73
55	33 Control	0.68	108	33 Antibiótico	0.82
56	33 Glutamina	0.73	109	33 Antibiótico	0.73
58	33 Antibiótico	0.75	110	33 Control	0.80
59	33 Glutamina	0.76	111	33 Glutamina	0.79
60	33 Control	0.73	112	33 Control	0.75
			113	33 Antibiótico	0.76
			114	33 Glutamina	0.77
			115	33 Control	0.90
			117	33 Antibiótico	0.90
			118	33 Antibiótico	0.82
			119	33 Glutamina	0.81
			120	33 Control	0.85

ID=Número de identidad del lechón, G:F= “Gain to Feed ratio”.

Se analizó la correlación que existe entre la “Gain to Feed ratio” y OTU utilizando el método Spearman. Se observó que la única OTU que posee un efecto positivo en la eficiencia alimenticia del lechón ($\rho = 0.48$, $q < 0.1$) es *Clostridium* sensu stricto en el grupo Control. No obstante, la presencia de bacterias pertenecientes a la familia de Enterobacteriaceae que no lograron ser identificadas encontradas en el grupo control y *Butyricoccus* (Cuadro 20) presente en el grupo de lechones tratados con glutamina, muestran un efecto negativo en la eficiencia alimenticia del animal ($\rho = -0.70$ y $\rho = -0.52$).

Esto puede suponer que al aumentar la presencia de *Clostridium* sensu stricto en el íleon del lechón, puede existir un aumento en la eficiencia alimenticia del animal, por consiguiente, un mayor crecimiento y desarrollo, como resultado del efecto de especies que pueden ser utilizadas como prebióticos, por ejemplo: *Clostridium butyricum* Mientras que la presencia de Enterobacteriaceae no clasificada y *Butyricoccus* en el íleon del animal, puede provocar una disminución en la eficiencia alimenticia y crecimiento del mismo.

El género *Clostridium* tiene aproximadamente 168 especies, de estas 77 especies se agrupan dentro del género *Clostridium* sensu stricto y se caracterizan por tener similitud en la secuencia genética del gen 16S rRNA. Este grupo está compuesto por organismos benéficos como patógenos para las personas y los animales (Vos *et al.* 2009).

Dentro de los organismos benéficos, se encuentran especies que utilizan mecanismo de producción de ácido acético y butírico. En el primer caso, la creación de este ácido inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos atravesando la membrana celular, posteriormente, se disocia y acidifica el citoplasma del patógeno, provocando la muerte. En el segundo caso, la presencia de ácido butírico posee características antimicrobiales y anti inflamatorias provocando un efecto positivo en las células del íleon y yeyuno (HUVEPHARMA 2015).

Estudios han demostrado que la presencia de estas especies benéficas dentro del género *Clostridium* sensu stricto, ayudan en la expresión de proteínas que combaten el efecto de la inflamación en el intestino y mejora el crecimiento, la función inmune y beneficia el balance de la microbioma intestinal en aves (Gao *et al.* 2011; Yang *et al.* 2012).

Las bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, se caracteriza por contener especies relacionadas con patogenicidad, grado de virulencia, resistencia a antibióticos o metabolismo en los lechones (Schierack *et al.* 2007), por lo que la presencia de estos microorganismos afectó en el rendimiento del lechón post-destete.

La presencia del género *Butyricoccus* en los lechones tratados con glutamina, presentó una relación negativa con el efecto que puede tener la presencia de esta bacteria en el íleon del lechón con la eficiencia alimenticia del animal. Se desconoce la razón por la cual este género obtuvo un efecto negativo en la eficiencia alimenticia, debido a que estudios anteriores demostraron que la especie *Butyricoccus pullicaecorum* que actúa como probiótico, ya que mejora la función de la barrera epitelial gastrointestinal y mejoró la eficiencia alimenticia en aves (Seal *et al.* 2013; Eeckhaut *et al.* 2016)

Cuadro 20. Identificación taxonómica de los OTU correlacionados con el “Gain to Feed ratio”.

OTU	Qval	rho	TRT	Filo	Familia	Género
17	0.046	-0.49	Ctn	Firmicutes	Lactobacillales	<i>Lactobacillus</i>
19	0.016	0.48	Ctn	Firmicutes	Clostridiales	<i>Clostridium</i> sensu stricto
36	0.098	-0.47	GLN	Proteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae no clasificada
41	0.006	-0.70	Ctn	Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae no clasificada
76	0.095	-0.51	GLN	Firmicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae no clasificada
	0.088	-0.52	GLN	Firmicutes	Clostridiales	<i>Butyricoccus</i>

OTU= Unidad Taxonómica Operacional, Qval= Valor q (q<0.1), rho= Grado de correlación, TRT= Tratamiento

4. CONCLUSIONES

- ◆ La presencia de antibióticos y glutamina en la dieta de los lechones post destete y transporte, no mostro un cambio significativo en la composición microbiana del íleon, mientras que, al no ser tratados con ningún aditivo, existe una diferencia significativa en la composición bacteriana a través del tiempo, provocado por la sucesión microbiana del intestino del animal.
- ◆ En la época de primavera, la población alfa de los lechones tratados con antibiótico y glutamina fue estadísticamente diferente en los días 13 y 33. Mientras que, en verano, ambos tratamientos fueron estadísticamente similares, la única variación en la composición se observó en los lechones sin tratamiento a través del tiempo.
- ◆ La presencia del género *Clostridium* sensu stricto, presentó un grado de relación en la mejora de la eficiencia alimenticia del lechón. Mientras que la presencia de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, encontradas en el grupo control, y *Butyricoccus*, encontrado en el grupo de glutamina, están relacionado con un efecto negativo o disminución en la eficiencia alimenticia del lechón post-destete y luego de ser trasladados hacia la granja.

5. RECOMENDACIONES

- ♦ Al solo obtener muestras del íleon de los lechones, no es posible extrapolar los resultados obtenidos para todo el intestino del animal. Se recomienda recolectar muestras del yeyuno, duodeno y ciego y realizar el mismo procedimiento y la aplicación de los mismos tratamientos, con el objetivo de poder visualizar el efecto de los tratamientos en la composición bacteriana del intestino en general.
- ♦ La unidad experimental de este estudio se basó en el corral, el cual estaba compuesto de 8 lechones. Se recomienda que, para el análisis de correlación sobre la eficiencia alimenticia y composición bacteriana del íleon del lechón, tomar muestras individuales de los animales y así poder determinar si el tratamiento causa un cambio en la composición bacteriana o si está relacionado con factores fisiológicos de cada animal.
- ♦ Para un estudio más detallado sobre el efecto de la glutamina en los lechones post-destete, se recomienda recolectar muestras de heces para medir la cantidad de glutamina que fue desechada y poder determinar cuanta cantidad del compuesto fue aprovechada por el animal.

6. LITERATURA CITADA

- Barton MD. 2014. Impact of antibiotic use in the swine industry. *Curr Opin Microbiol.* 19:9-15. doi:10.1016/j.mib.2014.05.017.
- Bischoff S. 2011. Gut health: A new objective in medicine. *BMC Medicine.* 9:24. doi:10.1186/1741-7015-9-24.
- Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Odle J. 2007. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev.* 87(2):545–564. doi:10.1152/physrev.00012.2006.
- Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F. 2003. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin Microbiol Rev*; [consultado 2018 may 5]. 16(2):175–188. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC153145/>.
- Campbell JM, Crenshaw JD, Polo J. 2013. The biological stress of early weaned piglets. *J Anim Sci Biotechnol.* 4(1):19. doi:10.1186/2049-1891-4-19.
- Correa JC. 2010. Diagnósticos de Regresión usando la FDR (Tasa de Descubrimientos Falsos). *Comunicaciones en Estadística*; [consultado 2018 jun 5]. 3(2). 10. <http://revistas.usta.edu.co/index.php/estadistica/article/download/22/21>.
- Coiler CT, Simiricky-Tjardes MR, Albin DM, Wubben JE, Gabert VM, Deplancke B, Bane D, Anderson DB, Gaskins HR. 2003. Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters. *J Anim Sci.* 81(12):3035-45. doi:10.2527/2003.81123035x.
- Dai ZL, Li XL, Xi PB, Zhang J, Wu G, Zhu W-Y. 2013. L-Glutamine regulates amino acid utilization by intestinal bacteria. *Amino Acid.* 45(3):501-12. doi:10.1007/s00726-012-1264-4.
- 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(4):459-72. doi:10.1089/fpd.2008.0107.

- Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol*; [consultado 2018 jun 10]. 38(10):3623-3630.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87447/pdf/jm003623.pdf>.
- Eeckhaut V, Wang, J, Van Parys A, Haesebrouck F, Joossens M, Falony G, Raes j, Ducatelle R, Van Immerseel F. 2016. The Probiotic *Butyricicoccus pullicecorum* reduces feed conversion and protects from potentially harmful intestinal microorganisms and Necrotic Enteritis in broilers. *Front Microbiol*. 7:1416. doi:10.3389/fmicb.2016.01416.
- Flint HJ, Bayer EA. 2008. Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. *Ann N Y Acad Sci*. 1125:280-8. doi:10.1196/annals.1419.022.
- Forchhammer K. 2007. Glutamine signalling in bacteria. *Front Biosci*. 1(12):358-70. doi:10.2741/2069.
- Gao Q, Qi L, Wu T, Wang J. 2011. Clostridium butyricum activates TLR2-mediated MyD88-independent signaling pathway in HT-29 cells. *Mol Cell Bioche*. 361(1-2):31-7. doi:10.1007/s11010-011-1084-y.
- Gotelli NJ, Chao A. 2013. Measuring and estimating species richness, species diversity, and biotic similarity from sampling data. *Encyclopedia of Diversity*; [consultado 2018 jun 10]. 5:195-211. <http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/paper/97.pdf>.
- Gresse R, Chaucheyras-Durand F, Fleury MA, van de Wiele T, Forano E, Blanquet-Diot S. 2017. Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: understanding the keys to health. *Trends Microbiol*. 25(10):851-873. doi:10.1016/j.tim.2017.05.004.
- Hardy B. 2002. The issue of antibiotic use in the livestock industry: What have we learned? *Anim Biotechnol*. 13(1):129-47. doi:10.1081/ABIO-120005775.
- Holland S. 2008. Non-metric multidimensional scaling (MDS) [Tesis]. Universidad de Georgia. Athens-Estados Unidos. 8 p.
- HUVEPHARMA. 2015. Miya-gold pigs: the unique probiotics. [consultado 2018 jun 12]. <http://www.huvepharma.com/files/products/pigs/TFAfec8w2c.pdf>.
- Isaacson R, Kim HB. 2012. The intestinal microbiome of the pig. *Anim Health Res Rev*. 13(1):100–109. doi:10.1017/S1466252312000084.
- Jiang ZY, Sun LH, Lin YC, Ma XY, Zheng CT, Zhou GL, Chen F, Zou ST. 2009. Effects of dietary glycyl-glutamine on growth performance, small intestinal integrity, and immune responses of weaning piglets challenged with lipopolysaccharide. *J Anim Sci*. 87(12):4050–4056. doi:10.2527/jas.2008-1120.

- Kim HB, Isaacson RE. 2015. The pig gut microbial diversity: understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Vet Microbiol.* 177(3-4):242-51. doi:10.1016/j.vetmic.2015.03.014.
- Koch RM, Swiger LA, Chambers D, Gregory KE. 1963. Efficiency of feed use in beef cattle. *Journal of Animal Science.* 22:486-494. doi:10.4236/ajcc.2015.45037.
- Konstantinov SR, Favier CF, Zhu WY, Williams BA, Klüß J, Souffrant W-B, Vos WM de, Akkermans ADL, Smidt H. 2004. Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. *Anim. Res.* 53:317-324. doi:10.1051/animres:2004019.
- Kozich J. 2013. 16S Sequencing with the Illumina MiSeq Personal Sequencer: Library generation, QC, sequencing, and data quality analysis procedures. [consultado 2018 jun 8]. https://www.mothur.org/w/images/0/0c/Wet-lab_MiSeq_SOP.pdf.
- Li K, Xiao Y, Chen J, Chen J, He X, Yang H. 2017. Microbial composition in different gut locations of weaning piglets receiving antibiotics. *Asian-Australas J Anim Sci.* 30(1):78-84. doi:10.5713/ajas.16.0285.
- Looft T, Allen HK, Cantarel BL, Levine UY, Bayles DO, 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(8):1566-76. doi:10.1038/ismej.2014.12.
- Looft TP. 2012. The swine intestinal microbiota: Localized adaptations and responses to in-feed antibiotics; [consultado 2018 mar 3]. <https://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?referer=https://www.google.hn/&httpsredir=1&article=3397&context=etd>.
- McCormack UM. 2017. Investigation and subsequent manipulation of the intestinal microbiota of pig, with a view to optimising feed efficiency. [Tesis]. Waterford Institute of Technology-Irlanda. 325p.
- Meimandipour A, Shuhaimi M, Soleimani AF, Azhar K, Hair-Bejo M, Kabeir BM, Javanmard A, Muhammad Anas O, Yazid AM. 2010. Selected microbial groups and short-chain fatty acids profile in a simulated chicken cecum supplemented with two strains of *Lactobacillus*. *Poult Sci.* 89(3):470-6. doi:10.3382/ps.2009-00495.
- MoBio. 2016. PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit: Instruction manual. Mo Bio Lab. [consultado 2018 jun 10]. <https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12855.pdf>.
- 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(1):G173-81. doi:10.1152/ajpgi.00197.2006.

- Newsholme P, Procopio J, Lima MMR, Pithon-Curi TC, Curi R. 2003. Glutamine and glutamate: Their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct.* 21(1):1-9. doi:10.1002/cbf.1003.
- Niu Q, Li P, Hao S, Zhang Y, Kim SW, Li H, Ma X, Gao S, He L, Wu W, et al. 2015. Dynamic distribution of the gut microbiota and the relationship with apparent crude fiber digestibility and growth stages in pigs. *Sci Rep.* 5: 9938. doi:10.1038/srep09938.
- Olszewski TD. 2004. A unified mathematical framework for the measurement of richness and evenness within and among multiple communities. *Oikos.* 104(2) 377-387. doi:10.1111/j.0030-1299.2004.12519.x.
- Pajarillo AB, Chae JP, Balolong MP, Bum Kim H, Kang DK. 2014. Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *J Gen Appl Microbiol.* [consultado 2018 jun 5]. 60(4):140-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25273987>.
- Pardo A. 2000. Análisis de varianza de un factor: El procedimiento ANOVA de un factor. Universidad de Barcelona. [consultado 2018 jun 5]. http://stel.ub.edu/sites/default/files/agenda/documents/14anova1_spss.pdf.
- Pascual LM, Daniele MB, Ruiz F, Giordano W, Pájaro C, Barberis L. 2008. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. *J Gen Appl Microbiol.* [consultado 2018 jun 10]. 54(3):141-148. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18654035>.
- Patel JB. 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn.* 6(4):313-21. doi:10.1054/modi.2001.29158.
- Pearce SC, Mani V, Weber TE, Rhoads RP, Patience JF, Baumgard LH, Gabler NK. 2013. Heat stress and reduced plane of nutrition decreases intestinal integrity and function in pigs. *J Anim Sci.* 91(11):5183-5193. doi:10.2527/jas.2013-6759.
- Pedersen R, Andersen AD, Mølbak L, Stagsted J, Boye M. 2013. Changes in the gut microbiota of cloned and non-cloned control pigs during development of obesity: Gut microbiota during development in cloned pigs. *BMC Microbiol.* 13:30. doi:10.1186/1471-2180-13-30.
- Pla L. 2006. Biodiversidad: Inferencia basada en el Índice de Shannon y la Riqueza. *Interciencia.* [consultado 2018 jun 10]. 31(8):583-590. <http://www.redalyc.org/pdf/339/33911906.pdf>.
- Ren W, Duan J, Yin J, Liu G, Cao Z, Xiong X, Chen S, Li T, Yin Y, Hou Y, Wu G. 2014. Dietary L-glutamine supplementation modulates microbial community and activates innate immunity in the mouse intestine. *Amino Acids.* 46(10):2403-13. doi:10.1007/s00726-014-1793-0.

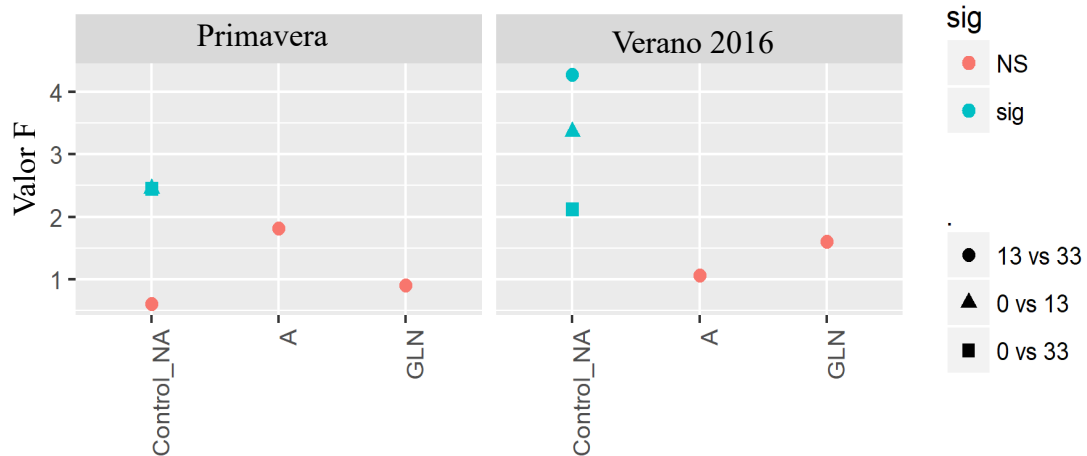
- Rettedal E, Vilain S, Lindblom S, Lehnert K, Scofield C, George S, Clay S, Kaushik RS, Rosa AJM, Francis D, Brözel VS. 2009. Alteration of the ileal microbiota of weanling piglets by the growth-promoting antibiotic chlortetracycline. *Appl Environ Microbiol.* 75(17):5489-95. doi:10.1128/AEM.02220-08.
- Riis AS. 2016. Colonisation and succession of the gut microbiota in suckling-and newly weaned piglets [Tesis]. Aarhus University. Foulum-Denmark. 206 p.
- Seal BS1, Lillehoj HS, Donovan DM, Gay CG. 2013. Alternatives to antibiotics: A symposium on the challenges and solutions for animal production. *Anim Health Res Rev.* 14(1):78-87. doi:10.1017/S1466252313000030.
- Schierack P, Walk N, Reiter K, Weyrauch KD, Wieler LH. 2007. Composition of intestinal Enterobacteriaceae populations of healthy domestic pigs. *Microbiology.* 153(11):3830-7. doi:10.1099/mic.0.2007/010173-0.
- Somerfield PJ. 2008. Identification of the Bray-Curtis similarity index: Comment on Yoshioka. *Marine Ecology Progress Series.* 372:303-306. doi:10.3354/meps07841.
- Stackebrandt E. 2001. Phylogeny based on 16S rRNA/DNA. *Encyclopedia of Life Science.* [consultado 2018 jun 8]. <http://uxmal.cifn.unam.mx/~docencia/pub/16SrRNAPhylogeny.pdf>.
- Su Y, Yao W, Perez-Gutierrez ON, Smidt H, Zhu WY. 2008. Changes in abundance of *Lactobacillus spp.* and *Streptococcus suis* in the stomach, jejunum and ileum of piglets after weaning. *FEMS Microbiol Ecol.* 66(3):546-55. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00529.x.
- Su Y, Zhu WY. 2006. Shift of the total bacterial and *lactobacilli* community in stomach of sucking and weaned piglets. *Par Ent Nutr;* 13:1-4.
- Sutherland MA, Backus BL, McGlone JJ. 2014. Effects of transport at weaning on the behavior, physiology and performance of pigs. *Animals (Basel).* 4(4):657-69. doi:10.3390/ani4040657.
- Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 3: The Firmicutes.* 2da ed. New York (Estados Unidos): Springer Dordrecht Heidelberg. [consultado 2018 jun 3]. <https://www.springer.com/gb/book/9780387950419>.
- Wang J, Chen L, Li P, Li X, Zhou H, Wang F, Li D, Yin Y, Wu G. 2008. Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. *J Nutr.* 138(6):1025-32. doi:10.1093/jn/138.6.1025.

Yang CM, Cao GT, Ferket PR, Liu TT, Zhou L, Zhang L, Xiao YP, Chen AG. 2012. Effects of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens. *Poult Sci.* 91(9):2121-9. doi:10.3382/ps.2011-02131.

Yang YX, Dai ZL, Zhu WY. 2014. Important impacts of intestinal bacteria on utilization of dietary amino acids in pigs. *Amino Acids.* 46(11):2489-501. doi:10.1007/s00726-014-1807-y.

7. ANEXOS

Anexo 1. Visualización de la variabilidad de medias evaluadas sobre la composición bacteriana de las muestras bajo los tratamientos dietéticos en los días 0, 13 y 33 en ambas temporadas.



Anexo 2. Visualización de la variabilidad de medias evaluadas sobre la composición bacteriana a través del tiempo y bajo el efecto de los tratamientos dietéticos en ambas temporadas.

