

# Probiotic effect of PROBIOLACTIL®, SUBTILPROBIO® and their mixture on productive and health indicators of growing pigs

## Efecto probiótico de PROBIOLACTIL®, SUBTILPROBIO® y su mezcla en indicadores productivos y de salud de cerdos en crecimiento

Ana J. Rondón<sup>1</sup>, Marvelys Socorro<sup>1</sup>, A. Beruvides<sup>1</sup>, Grethel Milián<sup>1</sup>, Marlen Rodríguez<sup>1</sup>, Fátima Arteaga<sup>2</sup> and R. Vera<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas. Autopista Varadero, km 3 ½, Matanzas, Cuba

<sup>2</sup>Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Finca El Limón, Calceta, Ecuador

Email: ana.rondon@umcc.cu

Ana J. Rondón: <https://orcid.org/0000-0003-3019-1971>

Marlen Rodríguez: <https://orcid.org/0000-0003-4248-3728>

Grethel Milián: <https://orcid.org/0000-0001-6074-7964>

Agustín Beruvides: <https://orcid.org/0000-0002-8525-6595>

Ronald Vera: <https://orcid.org/0000-0002-8663-2943>

Marvelys Socorro: <https://orcid.org/0000-0001-5242-4532>

Fátima Arteaga: <https://orcid.org/0000-0001-9122-1471>

To evaluate the probiotic effect of PROBIOLACTIL®, SUBTILPROBIO® biopreparations and their mixture, on productive and health indicators in growing pigs, an experiment with a completely randomized design was developed, with four treatments: 1) control) basal diet without additives, 2) basal diet + PROBIOLACTIL®, 3) basal diet + SUBTILPROBIO® and 4) basal diet + mixture of both biopreparations. As a result, it was confirmed that these additives and their mixture improved all indicators. Better effects were manifested in pigs that consumed PROBIOLACTIL®. The evaluated biopreparations produced benefits in animals, since they improved eubiosis of the gastrointestinal tract, which contributed to improve ( $P < 0.05$ ) live weight (27.15 kg/25.59 kg), daily mean gain of animals (408.65g/445.27g), weight gain (19.42kg/16.36 kg) and food conversion (2.44/2.90). Furthermore, the incidence of diarrhea decreased (8.57/67.14 %) in treated animals. Results confirm the probiotic potential of these biopreparations, when applied to pigs during growth stage, with better effects on those that consumed PROBIOLACTIL®.

Key words: *probiotics, Lactobacillus, Bacillus, zootechnical additives, pig farming*

Under production conditions, pigs can be affected by several environmental factors that stress them. In particular, neonatal and weaned animals are susceptible to physiological changes (feeding practices, farm management and nutritional needs), which can lead to the invasion of pathogenic bacteria that obstruct the microbial composition of the gastrointestinal tract of hosts (Yang *et al.* 2015).

To counteract this situation, antibiotics were used for a long time. However, different authors report that the indiscriminate use of these antimicrobials, in humans and animals, causes microbial resistance. Hence the need to replace these substances as growth promoters in animal production with other alternative additives, such as probiotics, which should be compatible with the environment and avoid negative effects on human health (Yeo *et al.* 2016 and Foko *et*

Para evaluar el efecto probiótico de los biopreparados PROBIOLACTIL®, SUBTILPROBIO® y su mezcla, en indicadores productivos y de salud en cerdos en crecimiento, se desarrolló un experimento con un diseño completamente aleatorizado, con cuatro tratamientos: 1) control dieta basal sin aditivos, 2) dieta basal + PROBIOLACTIL®, 3) dieta basal + SUBTILPROBIO® y 4) dieta basal + mezcla de ambos biopreparados. Como resultado, se comprobó que los aditivos y su mezcla mejoraron todos los indicadores. Se manifestaron efectos mayores en los cerdos que consumieron PROBIOLACTIL®. Los biopreparados evaluados produjeron beneficios en los animales, ya que mejoraron la eubiosis del tracto gastrointestinal, lo que contribuyó a mejorar ( $P < 0.05$ ) el peso vivo (27.15 kg/25.59 kg), la ganancia media diaria de los animales (408.65g/445.27g), el incremento de peso (19.42kg/16.36 kg) y la conversión alimentaria (2.44/2.90). Además, disminuyó la incidencia de diarreas (8.57/67.14 %) en los animales tratados. Los resultados confirman el potencial probiótico que tienen estos biopreparados, cuando se aplican a cerdos durante la etapa de crecimiento, con mejores efectos en los que consumieron PROBIOLACTIL®.

Palabras clave: *probióticos, Lactobacillus, Bacillus, aditivos zootécnicos, porcicultura.*

En condiciones de producción, los cerdos se pueden afectar por numerosos factores ambientales que les causan estrés. En particular, los animales neonatos y destetados son susceptibles a los cambios fisiológicos (prácticas de alimentación, manejo de la granja y necesidades nutricionales), que pueden provocar la invasión de bacterias patógenas que obstruyen la composición microbiana del tracto gastrointestinal del hospedero (Yang *et al.* 2015).

Para contrarrestar esta situación, los antibióticos se utilizaron durante mucho tiempo. Sin embargo, diferentes autores refieren que el uso indiscriminado de estos antimicrobianos, en el hombre como en los animales, provoca resistencia microbiana. De ahí la necesidad de sustituir estas sustancias como promotoras del crecimiento en la producción animal por otros aditivos alternativos, como los probióticos, que sean compatibles con el medio ambiente y eviten efectos negativos en la salud humana

*al.* 2018).

*LactoBacillus spp.* and *Bacillus spp.* cultures, from the digestive tract of animals, are among the products that show probiotic activity, which stand out for their effectiveness in improving production and health indicators (Rondón *et al.* 2018 and Milián *et al.* 2019).

The University of Matanzas and the Institute of Animal Science (ICA, initials in Spanish) carried out different research projects for the development of economically viable products that would improve productive yield and animal health (Pérez 2000, Milián 2009 and Rondón 2009). Among the obtained probiotics were SUBTILPROBIO® (culture of *Bacillus subtilis* C-31) and PROBIOLACTIL® (culture of *Lactobacillus salivarius* C-65), evaluated in broilers, layers (Rondón *et al.* 2018 and Milián *et al.* 2019), calves (del Valle 2017 and González 2019) and pigs (Ayala *et al.* 2014) with excellent results in weight gain, improvements in food conversion and decrease of diseases. However, the effect of these additives has not been evaluated yet, when they are applied mixed in the animal diet.

It is stated that when probiotics are supplied in the form of multi-strain cultures, or several microbial additives are mixed, the probiotic action tends to be enhanced in the digestive tract (Timmerman *et al.* 2004 and Zhang *et al.* 2017). Therefore, the objective of this study was to evaluate the probiotic effect of SUBTILPROBIO®, PROBIOLACTIL® biopreparations and their mixture, on productive and health indicators of growing pigs.

### Materials and Methods

*Preparation of PROBIOLACTIL® and SUBTILPROBIO® zootechnical additives.* From the *Lactobacillus salivarius* C-65 and *Bacillus subtilis* C-31 strains respectively, 20 L of each bioproduct were produced. For the preparation of additives, the methodology described by Rondón (2009) and Milián *et al.* (2017) was followed.

*Treatments and experimental conditions.* The experiment was carried out in the Unidad Porcina Gelpis, in Matanzas province. An amount of 200 crossbred pigs was used, weaned at 33 d, from York-Land (YL), Large White-Landrace (LWxL), and Duroc Jersey and L-3534 sires, from 34 to 76 d (42 d). The study took place from November 19 to December 30, 2018. During this period, a mean temperature of 26 °C ± 2, minimum of 20 °C ± 3 and maximum of 27 °C ± 1 was recorded. The mean relative humidity was 79 % ± 3. A completely randomized design was applied, in which four treatments were included, 50 animals each: 1 control) basal diet without additives, 2) basal diet + PROBIOLACTIL® additive (10 mL/animal/d), 3) basal diet + SUBTILPROBIO® additive (10 mL/animal/d) and 4) basal diet + mixture of PROBIOLACTIL® + SUBTILPROBIO® additives (5 mL/animal/d of each biopreparation).

(Yeo *et al.* 2016 y Foko *et al.* 2018).

Entre los productos que presentan actividad probiótica se encuentran los cultivos de *LactoBacillus spp.* y *Bacillus spp.*, procedentes del tracto digestivo de los animales, los que se destacan por su efectividad en la mejora de los indicadores productivos y de salud (Rondón *et al.* 2018 y Milián *et al.* 2019).

La Universidad de Matanzas y el Instituto de Ciencia Animal (ICA) ejecutaron diferentes proyectos de investigación para el desarrollo de productos económicamente viables que mejoraran el rendimiento productivo y la salud de los animales (Pérez 2000, Milián 2009 y Rondón 2009). Entre los probióticos que se obtuvieron se encuentra el SUBTILPROBIO® (cultivo de *Bacillus subtilis* C-31) y PROBIOLACTIL® (cultivo de *Lactobacillus salivarius* C-65), evaluados en pollos de ceba, ponedoras (Rondón *et al.* 2018 y Milián *et al.* 2019), terneros (Del Valle 2017 y González 2019) y cerdos (Ayala *et al.* 2014) con excelentes resultados en el incremento de peso, mejoras en la conversión alimentaria y disminución de enfermedades. No obstante, no se ha evaluado aún el efecto de estos aditivos, cuando se aplican mezclados en la dieta de los animales.

Se plantea que cuando los probióticos se suministran en forma de cultivos multicepas, o se mezclan varios aditivos microbianos, se tiende a potenciar la acción probiótica en el tracto digestivo (Timmerman *et al.* 2004 y Zhang *et al.* 2017). De ahí que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto probiótico de los biopreparados SUBTILPROBIO®, PROBIOLACTIL® y su mezcla, en indicadores productivos y de salud de cerdos en crecimiento.

### Materiales y Métodos

*Elaboración de los aditivos zootécnicos PROBIOLACTIL® y SUBTILPROBIO®.* A partir de las cepas *Lactobacillus salivarius* C-65 y *Bacillus subtilis* C-31, respectivamente, se produjeron 20 L de cada bioproducto. Para la elaboración de los aditivos se siguió la metodología descrita por Rondón (2009) y Milián *et al.* (2017).

*Tratamientos y condiciones experimentales.* El experimento se realizó en la Unidad Porcina Gelpis, de la provincia de Matanzas. Se utilizaron 200 cerdos mestizos, destetados a los 33 d, provenientes de reproductoras York-Land (YL), Large White-Landrace (LWxL), y sementales Duroc Jersey y L-3534, desde los 34 hasta los 76 d (42 d). El estudio tuvo lugar entre el 19 de noviembre al 30 de diciembre del 2018. Durante este período, se registró temperatura media de 26 °C ± 2, mínima de 20 °C ± 3 y máxima de 27 °C ± 1. La humedad relativa promedio fue de 79 % ± 3. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado, en el que se incluyeron cuatro tratamientos, de 50 animales cada uno: 1) control, dieta basal sin aditivos, 2) dieta basal + aditivo PROBIOLACTIL® (10 mL/animal/d), 3) dieta basal + aditivo SUBTILPROBIO® (10 mL/animal/d) y 4) dieta basal + mezcla de los aditivos PROBIOLACTIL® + SUBTILPROBIO® (5 mL/animal/d de cada biopreparado).

Doses of additives was adjusted to  $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>, which were mixed with water for homogenization. Samplings were carried out at 34, 45, 60 and 76 d.

*Feeding and management conditions.* Table 1 shows the composition of the provided diet. Food was provided in the form of corn-soy-based meal, according to NRC (2012).

La dosis de los aditivos se ajustó a  $10^9$  UFC. mL<sup>-1</sup>, que se mezclaron con agua para su homogenización. Los muestreos se realizaron a los 34, 45, 60 y 76 d.

*Condiciones de alimentación y manejo.* La composición de la dieta suministrada se muestra en la tabla 1. El alimento se proporcionó en forma de harina basada en maíz-soya, según NRC (2012).

Table 1. Composition and contribution, under dry basis, of the diet consumed by pigs

Ingredients	Inclusion, %
Corn meal	70.36
Soy bean meal	27.00
Sodium chloride	0.50
Calcium carbonate	0.50
Dicalcium phosphate	1.00
Premix <sup>1</sup>	0.50
Choline	0.14
Contribution	
DM, %	90.81
CP, %	19.00
ME, MJ kg <sup>-1</sup>	18.97
Ca, %	0.61
P, %	0.49
C, %	4.55

<sup>1</sup>Premix of vitamins and minerals per kg of concentrate: vitamin A, 12,000 IU; vitamin D, 2,600 IU; vitamin E, 30 IU; vitamin B12.12 ug; vitamin K, 3 mg; calcium pantothenate, 15 mg; nicotinic acid, 40 mg; choline, 400 mg; Mn, 40 mg; Zn, 40 mg; Fe, 40 mg; Cu, 8.8 mg; I, 0.35 mg and Se, 0.3 mg.

DM: Dry matter; CP: Crude protein; ME: metabolizable energy; Ca: calcium; P: phosphorus; C: ashes

Facilities, in which pigs were housed (Flat Decks system), underwent a sanitary authorization, as established for these animals (IIP 2008). Ten pigs were located per pen, for a total of 20 pens. Water was provided ad libitum and food intake was restricted according to consumption regulations established for this category (GRUPOR 2017).

*Determination of the effect of biopreparations and the mixture on microbiological, productive and health indicators.* For determining microbiological indicators, samples of fecal content (1 g) were taken from 10 piglets per treatment at 34, 45, 60 and 76 d. They were homogenized in 9 mL of diluent medium (Caldwell and Bryant 1966) and immediately processed under anaerobic conditions (5 % CO<sub>2</sub> atmosphere). To perform the count of lactic acid bacteria (LAB) and coliforms, serial dilutions of samples (1:10, w/v) were carried out in a diluent medium until 10-11. Out of these dilutions, 10-9,

Las naves donde se alojaron los cerdos (sistema Flat Decks) se sometieron a una habilitación sanitaria, según lo establecido para estos animales (IIP 2008). Se dispusieron 10 cerdos por corral, para un total de 20 corrales. El suministro de agua fue ad libitum y el consumo de alimentos se restringió según las normas de consumo establecidas para esta categoría (GRUPOR 2017).

*Determinación del efecto de los biopreparados y la mezcla en los indicadores microbiológicos, productivos y de salud.* Para los indicadores microbiológicos, a los 34, 45, 60 y 76 d, se tomaron muestras del contenido fecal (1 g) de 10 cerditos por tratamiento. Se homogenizaron en 9 mL de medio diluyente (Caldwell y Bryant 1966) y se procesaron de inmediato en condiciones anaerobias (5 % de atmósfera de CO<sub>2</sub>). Para efectuar el conteo de bacterias ácido lácticas (BAL) y coliformes se realizaron diluciones seriadas de las muestras (1:10, p/v) en medio diluyente hasta 10-11. De estas diluciones, se utilizaron para las BAL 10-9, 10-10 y 10-11, y para coliformes 10-6,10-7 y 10-8. Cada

10-10 and 10-11 were used for LAB, and 10-6,10-7 and 10-8 for coliforms. Each was replicated three times (0.5 mL) on plates containing selective culture medium. For coliforms, violet red bile agar (OXOID) was used, and, for LAB, MRS agar (CONDO, Spain). After incubating at 37 °C (for 72 h for LAB and 24 h for coliforms), microbial count was performed. The CFU number was determined under magnifying glass by visual colony count. In productive and health indicators, live weight of pigs was evaluated every week and daily mean gain (DMG), food conversion (FC) and weight gain (WG) were calculated. The incidence of diarrhea and mortality in animals was also observed every day.

**Statistical processing.** For data analysis, the statistical program INFOSTAT, version 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012) was used. For productive variables, a one-way analysis of variance model was applied, after checking the normal distribution of data and the variance homogeneity using Shapiro and Wilk (1965) and Levene (1960) tests, respectively. Microbial counts were transformed to LN and subsequently to  $\sqrt{X}$ , and normality was checked again. Differences between groups were verified using Duncan (1955) multiple range comparison test. Results of diarrhea incidence were analyzed using ComparPro version 1 program (Font *et al.* 2007).

una se replicó tres veces (0.5 mL) en placas que contenían medio de cultivo selectivo. Para coliformes se utilizó agar bilis rojo - violeta (OXOID) y para BAL, agar MRS (CONDO, España). Después de incubar a 37 °C (durante 72 h para BAL y 24 h para coliformes), se realizó el conteo microbiano. El número de UFC se determinó bajo lupa por conteo visual de colonias. En los indicadores productivos y de salud, se evaluó el peso vivo de los cerdos todas las semanas y se calculó la ganancia media diaria (GMD), conversión alimentaria (CA) e incremento de peso (IP). También se observó cada día la incidencia de diarreas y la mortalidad en los animales.

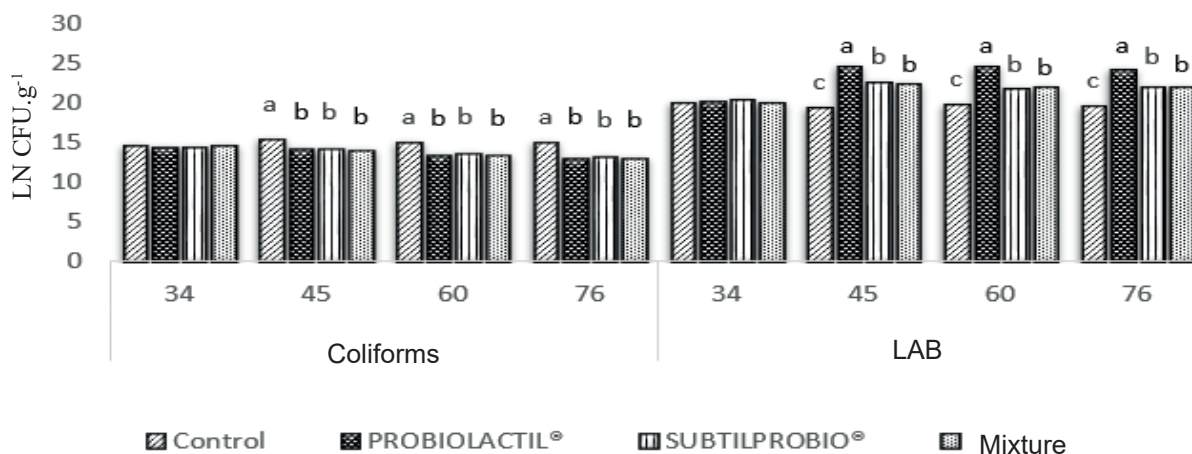
**Procesamiento estadístico.** Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico INFOSTAT, versión 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012). Para las variables productivas se aplicó un modelo de análisis de varianza simple, previa comprobación de la distribución normal de los datos y de la homogeneidad de varianza mediante las dósimas de Shapiro y Wilk (1965) y de Levene (1960), respetivamente. Los conteos microbianos se transformaron a LN y posteriormente a  $\sqrt{X}$ , y se comprobó nuevamente la normalidad. Las diferencias entre grupos se verificaron por medio de la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan (1955). Los resultados de la incidencia de diarreas se analizaron mediante el programa ComparPro versión 1 (Font *et al.* 2007).

**Results and Discussion**

Figure 1 shows the effect of PROBIOLACTIL®, SUBTILPROBIO® and its mixture, on the performance of coliform and LAB populations in feces of growing pigs. At 34 d, there were no differences in the count of these microbial groups in the different treatments. However, after 45, there was an increase (P <0.05) of LAB and a decrease of coliforms in the groups in which biopreparations were applied, with respect to control. Furthermore, it was found that, out of the additives used,

**Resultados y Discusión**

En la figura 1 se muestra el efecto de PROBIOLACTIL®, SUBTILPROBIO® y su mezcla en el comportamiento de la población de coliformes y BAL en las heces fecales de cerdos en crecimiento. A los 34 d, no se presentaron diferencias en el conteo de estos grupos microbianos en los diferentes tratamientos. Sin embargo, a partir de los 45, hubo incremento (P < 0.05) de las BAL y disminución de los coliformes en los grupos en los que se aplicaron los biopreparados, con respecto al control. Además, se comprobó que de los aditivos



<sup>a,b,c</sup> Columns with different letters differ at P < 0.05 (Duncan 1955)

Coliforms: 34 d SE ± 0.39, P=0.3307; 45 d, SE ± 0.83, P=0.001; 60 d, SE ± 0.70, P=0.001 and 76 d, SE ± 0.88, P=0.001, LAB: 34 d, SE ± 0.089, P=0.2206; 45 d, SE ± 0.42, P=0.001; 60 d SE ± 0.56, P=0.001 and 76 d, SE±0.31, P=0.001. SE: Standard error

Figure 1. Effect of PROBIOLACTIL®, SUBTILPROBIO® and their mixture on the performance of coliform and LAB populations in feces of growing pigs

PROBIOLACTIL® was the one that caused the greatest increase ( $P < 0.05$ ) of LAB population.

The addition of this biopreparation, containing *Lactobacillus salivarius*, should have increased LAB population in the GIT, which are part of the native microbiota of this ecosystem. According to Pieper *et al.* (2006), *Lactobacillus salivarius*, *L. fermentum* and *L. acidophilus* species are the most abundant lactobacilli of the microbial community that inhabits the pig ileum during weaning period.

These results indicate that the application of the additive PROBIOLACTIL® in the established dose caused the colonization of the gastrointestinal tract of the pigs under study. Many probiotics, especially lactic acid bacteria, ferment carbohydrates to produce short-chain fatty acids, such as lactic acid and acetic acid, which lowers luminal pH to levels in which potentially pathogenic bacteria do not develop (Segura and de Bloss 2000).

It is also known that these bacteria produce bacteriocins and hydrogen peroxide (Price and Lee 1970 and Nazef *et al.* 2008). These substances generally destroy the integrity of the cytoplasmic membrane by forming transmembrane pores, causing the release of amino acids and ATP. Therefore, the electrochemical gradient is not generated nor the proton-motive force is reached, necessary for ATP synthesis (Bajagai *et al.* 2016).

Rondón *et al.* (2012) determined *in vitro* that *Lactobacillus salivarius* C-65 species inhibited *Escherichia coli* 0157: H7 from the production of acids and bacteriocins. It is known that *L. salivarius* is a very prolific microorganism in the intestine, making it capable of competing with many others, including some pathogenic bacteria (Riboulet-Bisson *et al.* 2012). Among them, *L. salivarius* is characterized by being a very effective probiotic bacteria, since it performs an essential function in maintaining a healthy digestive system.

Figure 2 shows the performance of live weight in the evaluated animals, with the use of PROBIOLACTIL®, SUBTILPROBIO® and its mixture during pre-fattening. An increase of live weight ( $P < 0.05$ ) was observed in pigs treated with the biopreparations with respect to control group. This increase was observed after 11 d of application, which corresponds to 45 d of birth. Regarding control, it was found that from that age, up to 76 d, weight gain occurred in all the treatments in which biopreparations were applied. However, the best results were achieved with the administration of PROBIOLACTIL®, followed by SUBTILPROBIO® and their mixture.

The best results were obtained in pigs treated with PROBIOLACTIL®. This biopreparation contains *Lactobacillus salivarius* C-65, a microorganism found in the digestive tract of different animals of zootechnical interest.

utilizados, PROBIOLACTIL® fue el que provocó mayor aumento ( $P < 0.05$ ) de la población de BAL.

La adición de este biopreparado, que contiene *Lactobacillus salivarius*, debió aumentar la población de BAL en el TGI, las cuales forman parte de la microbiota nativa de este ecosistema. De acuerdo con Pieper *et al.* (2006), las especies *Lactobacillus salivarius*, *L. fermentum* y *L. acidophilus* son los lactobacilos más abundantes de la comunidad microbiana que habita en el íleon de los cerdos durante el período del destete.

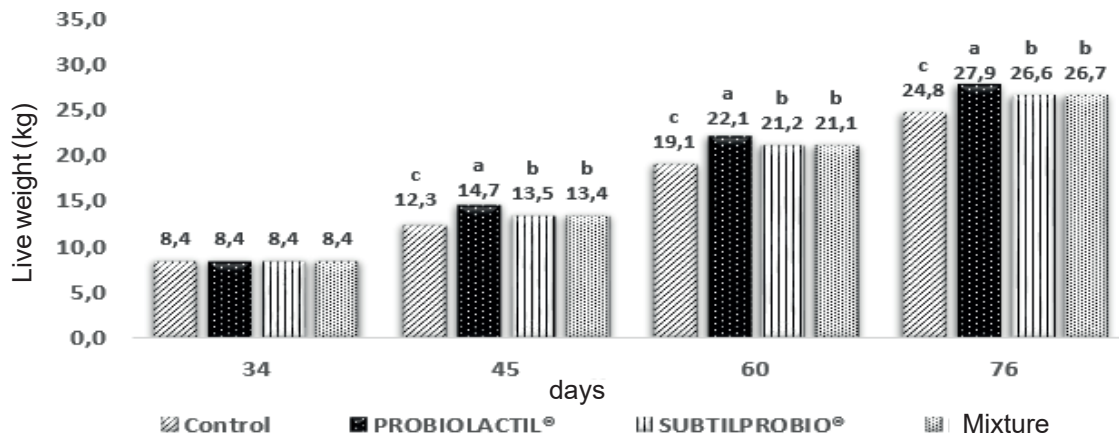
Estos resultados indican que la aplicación del aditivo PROBIOLACTIL® en la dosis establecida provocó la colonización del tracto gastrointestinal de los cerdos en estudio. Muchos probióticos, especialmente las bacterias ácido lácticas, fermentan carbohidratos para producir ácidos grasos de cadena corta, como el ácido láctico y ácido acético, lo que disminuye el pH luminal a niveles en los que las bacterias potencialmente patógenas no se desarrollan (Segura y De Bloss 2000).

Se conoce además, que dichas bacterias producen bacteriocinas y peróxido de hidrógeno (Price y Lee 1970 y Nazef *et al.* 2008). Por lo general, estas sustancias destruyen la integridad de la membrana citoplasmática mediante la formación de poros transmembranales, lo que provoca la salida de aminoácidos y ATP. Por tanto, no se genera el gradiente electroquímico ni se alcanza la fuerza protomotriz necesaria para la síntesis de ATP (Bajagai *et al.* 2016).

Rondón *et al.* (2012) determinaron *in vitro* que la especie *Lactobacillus salivarius* C-65 inhibió a *Escherichia coli* 0157:H7 a partir de la producción de ácidos y bacteriocinas. Se conoce que *L. salivarius* es un microorganismo muy prolífico en el intestino, por lo que es capaz de competir con muchos otros, entre los que se incluyen algunas bacterias patógenas (Riboulet-Bisson *et al.* 2012). Entre ellas, *L. salivarius* se caracteriza por ser una bacteria probiótica muy eficaz, ya que desarrolla una función muy importante en el mantenimiento del sistema digestivo de forma saludable.

En la figura 2 se muestra el comportamiento del peso vivo en los animales evaluados, con el uso del PROBIOLACTIL®, el SUBTILPROBIO® y su mezcla durante la preceba. Se observó incremento del peso vivo ( $P < 0.05$ ) en los cerdos que se trataron con los biopreparados con respecto al grupo control. Este aumento se observó a partir de los 11 d de aplicado, lo cual se corresponde con los 45 d de nacidos. En relación con el control, se comprobó que a partir de esa edad, hasta los 76 d, se produjo aumento del peso en todos los tratamientos en los que se aplicaron los biopreparados. Sin embargo, los mejores resultados se lograron con la administración del PROBIOLACTIL®, seguido del SUBTILPROBIO® y la mezcla de ambos.

Los mejores resultados se obtuvieron en los cerdos tratados con PROBIOLACTIL®. Este biopreparado contiene *Lactobacillus salivarius* C-65, microorganismo que se encuentra en el tracto digestivo de diferentes animales de interés zootécnico.



<sup>a,b,c</sup> Columns with different letters differ at  $P < 0.05$  (Duncan 1955)

34 d, SE  $\pm 0.019$ ,  $P=0.3307$ , 45 d, SE  $\pm 0.093$ ,  $P=0.001$ , 60 d, SE  $\pm 0.070$ ,  $P=0.001$  and 76 d, SE  $\pm 0.098$ ,  $P=0.001$

Figure 2. Live weight performance during the experiment

Iñiguez-Palomares *et al.* (2007) isolated eight strains of *Lactobacillus*, with probiotic potential, from the GIT of pigs due to their resistance to gastrointestinal transit barriers, to the property of adhering to the intestinal mucosa and to antibacterial activity against pathogenic microorganisms. However, *L. salivarius* was the species that fulfilled all the criteria to be selected as a probiotic.

The results of this study are in correspondence with criteria of authors who state that, with the use of zootechnical additives, apparent retention of nutrients included in the diet is increased (amount of consumed nutrients minus the amount of excreted nutrients) and the N, P and Ca (Ángel *et al.* 2005) retention is favored. *Lactobacillus* supplementation increases the activity of digestive enzymes, such as  $\beta$ -galactosidase, which stimulates gastrointestinal peristalsis and promotes nutrient digestibility (Zhao and Kim 2015).

Table 2 shows the performance of productive indicators in pigs that consumed the different biopreparations.

Iñiguez-Palomares *et al.* (2007) aislaron ocho cepas de *Lactobacillus* del TGI de cerdos que poseían potencial probiótico, debido a su resistencia a las barreras del tránsito gastrointestinal, a la propiedad de adherirse a la mucosa intestinal y a la actividad antibacteriana ante microorganismos patógenos. Sin embargo, *L. salivarius* fue la especie que cumplió con todos los criterios para ser seleccionada como probiótico.

Los resultados de este estudio están en correspondencia con criterios de autores que plantean que con la utilización de los aditivos zootécnicos se incrementa la retención aparente de los nutrientes incluidos en la dieta (cantidad de nutrientes consumidos menos la cantidad de nutrientes excretados) y se favorece la retención de N, P y Ca (Ángel *et al.* 2005). La suplementación de *Lactobacillus* produce el aumento de la actividad de las enzimas digestivas, como la  $\beta$ -galactosidasa, que estimula la peristalsis gastrointestinal y promueve la digestibilidad de los nutrientes (Zhao y Kim 2015).

En la tabla 2 se muestra el comportamiento de los

Tabla 2. Performance of productive indicators in growing pigs, supplemented with PROBIOLACTIL®, SUBTILPROBIO® and their mixture

Indicators	Treatments				SE $\pm$ Sign
	Control	PROBIOLACTIL®	SUBTILPROBIO®	Mixture	
DMG, g	408.65 <sup>c</sup>	445.27 <sup>a</sup>	431.58 <sup>b</sup>	431.89 <sup>b</sup>	0.40 $P=0.001$
Weight gain, kg	16.36 <sup>c</sup>	19.42 <sup>a</sup>	18.22 <sup>b</sup>	18.28 <sup>b</sup>	0.10 $P=0.001$
DM intake, kg <sup>-1</sup> LW	47.43	47.43	47.43	47.43	-
Food conversion	2.90 <sup>a</sup>	2.44 <sup>c</sup>	2.60 <sup>b</sup>	2.59 <sup>b</sup>	0.024 $P=0.001$

<sup>a, b, c</sup> Medias con letras distintas difieren para  $P < 0.05$  (Duncan 1955).

DMG: daily mean gain. SE: standard error. Number of animals per treatment: 50

These results are similar to those observed by Dowarah *et al.* (2018), who described that probiotic supplementation to growing pigs improved DMG and FC during 180 d. These criteria demonstrate that these microorganisms improve the use of nutrients contained in the diet.

indicadores productivos en los cerdos que consumieron los diferentes biopreparados.

Estos resultados son similares a los observados por Dowarah *et al.* (2018), quienes describieron que la suplementación de probióticos a cerdos en crecimiento mejoró la GMD y la CA durante 180 d.

Table 3 shows results of diarrhea incidence during the experiment. These may be associated with different action mechanisms proposed for probiotics, including normalization of altered microbial population, improvement of the intestinal immune barrier, particularly through secretory IgA response, and decrease of intestinal inflammatory responses. (Zhang *et al.* 2011, Khare *et al.* 2018 and Plaza *et al.* 2019).

Estos criterios demuestran que cuando se utilizan estos microorganismos se produce mejor aprovechamiento de los nutrientes contenidos en la dieta.

En la tabla 3 se muestran los resultados de la incidencia de diarreas durante el experimento. Estos se pueden asociar a diferentes mecanismos de acción propuestos para los probióticos, entre los que se incluyen la normalización de la población microbiana alterada, el mejoramiento de la

Table 3. Diarrhea incidence on pre-fattening pigs, supplemented with PROBIOLACTIL®, SUBTILPROBIO® and their mixture for 42 d

Indicators	Treatments	Number of diarrheas	%	SE± Sign
Diarrhea incidences	Control	94	67.14 <sup>a</sup>	
	PROBIOLACTIL®	12	8.57 <sup>c</sup>	
	SUBTILPROBIO®	22	15.71 <sup>b</sup>	0.56 P<0.001
	Mixture	20	14.28 <sup>b</sup>	
Total of animals	200	140	100.00	

<sup>a,b,c</sup> Percentages with different letters differ at P < 0.001 (Duncan 1955)

The incidence of diarrhea showed lower values in the animals that consumed the additives, a result that coincides with studies of Lu *et al.* (2018), who referred to the reduction of mortality and the presence of animals with diarrhea when probiotics are applied. Kim *et al.* (2018) studied the dynamics of intestinal microbial diversity during pig weaning, after providing food supplemented with probiotic bacteria. The bioassay results indicated that, in the presence of *Lactobacillus acidophilus* 30SC, the activity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 was inhibited, while lactobacilli population increased in weaned pigs.

Other researchers, such as Deng *et al.* (2013), also applied a mixture of *Bacillus RJGP16* and *Lactobacillus salivarius* B1 to assess its effect on the stimulation of the immune system of pigs. These authors observed an increase of the production of interleukin (IL)-6 and porcine beta-defensins (pBD)-2 in the duodenum and ileum (P < 0.01). They also confirmed an increase in the number of immunoglobulin (Ig) A (P < 0.01) in the intestinal lumen. All these actions contribute to the reduction of potentially pathogenic microorganisms, which cause the presence of diarrhea.

Regarding these results, it is stated that probiotic microorganisms create a complex with animal own bacteria to favor defense mechanisms, production of antimicrobial substances, intestinal pH decrease, bacterial antagonism and stimulation of the activity of macrophages and lymphocytes, which influence on better productive yields (Bajagai *et al.* 2016 and Markowiak and Śliżewska 2018).

Results similar to those of this study were obtained by Dowarah *et al.* (2017), who evaluated the efficacy of two probiotics (*Lactobacillus acidophilus* NCDC-15 and *Pediococcus acidilactici* FT28) in weight gain, diarrhea

barrera inmunológica intestinal, particularmente mediante la respuesta de IgA secretoria, y la disminución de las respuestas inflamatorias intestinales (Zhang *et al.* 2011, Khare *et al.* 2018 y Plaza *et al.* 2019).

La incidencia de diarreas mostró valores más bajos en los animales que consumieron los aditivos, resultado que coincide con los trabajos de Lu *et al.* (2018), quienes refieren la reducción de la mortalidad y la presencia de animales con diarreas cuando se aplican probióticos. Kim *et al.* (2018) investigaron la dinámica de la diversidad microbiana intestinal durante el destete de cerdos, después de administrar alimento suplementado con bacterias probióticas. Los resultados del bioensayo indicaron que en presencia de *Lactobacillus acidophilus* 30SC, la actividad de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 se inhibió, mientras que la población de lactobacilos aumentó en los cerdos destetados.

Otros investigadores, como Deng *et al.* (2013), también aplicaron una mezcla de *Bacillus RJGP16* y *Lactobacillus salivarius* B1 para evaluar su efecto en la estimulación del sistema inmune de cerdos. Observaron el aumento de la producción de interleuquina (IL)-6 y las beta-defensinas porcinas (pBD)-2 en el duodeno y el íleon (P < 0.01). También constataron incremento en el número de inmunoglobulina (Ig) A (P < 0.01) en el lumen intestinal. Todas estas acciones contribuyen a la disminución de microorganismos potencialmente patógenos, causantes de la presencia de diarreas.

Con respecto a estos resultados, se plantea que los microorganismos probióticos crean un complejo con las bacterias propias del animal para favorecer los mecanismos de defensa, la producción de sustancias antimicrobianas, la disminución del pH intestinal, el antagonismo bacteriano y la estimulación de la actividad de macrófagos y linfocitos, lo que influye en mejores rendimientos productivos (Bajagai *et al.* 2016 y Markowiak y Śliżewska 2018).

Resultados similares a los de este estudio obtuvieron

incidence, intestinal microbiota composition and pig health. These authors concluded that supplementation of these additives in basal diet improved growth performance, fecal microbial count and intestinal morphology in pigs. In addition, they considered that *P. acidilactici* FT28 strain was more effective in reducing diarrheas and maintaining the acidic environment of the digestive tract, indicating a synergic probiotic effect between these bacteria and the intestinal microbiota to promote animal health.

These results may be given because lactobacilli, unlike *Bacillus*, have the ability to colonize and adhere to intestinal mucosa, thus inhibiting potentially pathogenic microorganisms. They produce organic acids and maintain the integrity of epithelial cells. In addition, they can multiply under anaerobic conditions and remain viable for 28 d, after stopping treatment. They also activate the immune system and improve host health (Blajman *et al.* 2015, Pluske *et al.* 2018 and Hernández *et al.* 2019). Regarding the results of the mixture, it is evident the need to evaluate higher doses than those established for each additive, in order to analyze its effect on animals.

### Conclusions

Results confirm the probiotic potential of these biopreparations, when applied to pigs during their growth stage, with better effects on those who consumed PROBIOLACTIL, a probiotic made up of *Lactobacillus salivarius*.

Dowarah *et al.* (2017), quienes evaluaron la eficacia de dos probióticos (*Lactobacillus acidophilus* NCDC-15 y *Pediococcus acidilactici* FT28) en el incremento de peso, la incidencia de diarreas, la composición de la microbiota intestinal y la salud de los cerdos. Estos autores concluyeron que la suplementación de estos aditivos en la dieta basal mejoró el rendimiento del crecimiento, el recuento microbiano fecal y la morfología intestinal en cerdos. Además, consideraron que la cepa *P. acidilactici* FT28 fue más efectiva en la reducción de las diarreas y el mantenimiento del ambiente ácido del tracto digestivo, lo que indica un efecto probiótico sinérgico entre estas bacterias y la microbiota intestinal para promover la salud del animal.

Estos resultados pueden estar dados porque los lactobacilos, a diferencia de *Bacillus*, tienen la capacidad de colonizar y adherirse a la mucosa intestinal, inhibiendo así a los microorganismos potencialmente patógenos. Producen ácidos orgánicos y mantienen la integridad de las células epiteliales. Además, se pueden multiplicar en condiciones anaerobias y permanecer viables durante 28 d, después de suspender el tratamiento; también activan el sistema inmune y mejoran la salud del hospedero (Blajman *et al.* 2015, Pluske *et al.* 2018 y Hernández *et al.* 2019). Con respecto a los resultados de la mezcla, se evidencia la necesidad de evaluar dosis superiores a las establecidas para cada aditivo, con el propósito de analizar su efecto en los animales.

### Conclusiones

Los resultados confirman el potencial probiótico que tienen estos biopreparados, cuando se aplican a cerdos durante la etapa de crecimiento, con mejores efectos en los que consumieron PROBIOLACTIL, un probiótico constituido por *Lactobacillus salivarius*.

### References

- Ángel, R., Dalloul, R.A. & Doerr, J. 2005. "Metabolism and nutrition: Performance of broiler chickens fed diets supplemented with a direct-fed microbial". *Poultry Science*, 84(8):1222-1231, ISSN: 1525-3171, DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/84.8.1222>.
- Ayala, L., Boucourt, R., Castro, M., Dihigo, L.E., Milián, G., Herrera, M. & Ly, J. 2014. "Development of the digestive organs in piglets born from sows consuming probiotic before farrowing and during lactation". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 48(2): 347-351, ISSN: 2079-3480.
- Bajagai, Y.S., Klieve, A.V., Dart, P.J. & Bryden, W.L. 2016. Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation. Makkar, H.P.S (ed.). *FAO Animal Production and Health Paper No. 179*, Rome, Italy, ISBN: 978-92-5-109333-7.
- Blajman, J., Gaziano, C., Zbruna, M.C., Soto, L., Astesana, D., Berisvil, A., Romero, A., Signorini, M. & Frizzo, L. 2015. "In vitro and in vivo screening of native lactic acid bacteria toward their selection as a probiotic in broiler chickens". *Research in Veterinary Science*, 101: 50-56, ISSN: 0034-5288, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.05.017>.
- Caldwell, D.R. & Bryant, M.P. 1966. "Medium without fluid for non-selective enumeration and isolation of rumen bacteria". *Applied and Environmental Microbiology*, 14(5): 794-801, ISSN: 1098-5336.
- Del Valle, A. 2017. Obtención de un biopreparado simbiótico, a partir de la mezcla de pulpa de *Agave fourcroydes* Lem. y PROBIOLACTIL®, para su aplicación en terneros. Diploma Thesis. Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba.
- Deng, J., Li, Y., Zhang, J. & Yang, Q. 2013. "Co-administration of *Bacillus subtilis* RJGP16 and *Lactobacillus salivarius* B1 strongly enhances the intestinal mucosal immunity of piglets". *Research in Veterinary Science*, 94(1): 62-68, ISSN: 0034-5288, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.025>.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. InfoStat version 2012 [Windows]. Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available: <http://www.infostat.com.ar>
- Dowarah, R., Verma, A.K. & Agarwal, N. 2017. "The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review". *Animal Nutrition*, 3(1): 1-6, ISSN: 2405-6545, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.11.002>.
- Dowarah, R., Verma, A.K., Agarwal, N., Singh, P. & Singh, B.R. 2018. "Selection and characterization of probiotic lactic acid



- bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets". *PloS One*, 13(3): e0192978, ISSN: 1932-6203, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192978>.
- Duncan, D.B. 1955. "Multiple range and multiple F test". *Biometrics*, 11(1): 1-42, ISSN: 0006-341X, DOI: <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- Foko, K.E.M., Zambou, N.F., Kaktcham, P.M., Wang, R.Y., Zhu, T. & Yin, L. 2018. "Screening and characterization of *Lactobacillus sp.* from the water of cassava's fermentation for selection as probiotics". *Food Biotechnology*, 32(1): 15-34, ISSN: 1532-4249, DOI: <https://doi.org/10.1080/08905436.2017.1413984>.
- Font, H., Noda, A., Torres, V., Herrera, M., Lizazo, D., Sarduy, L. & Rodríguez, L. 2007. Paquete estadístico ComparPro versión 1. Departamento de Biomatemática, Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.
- González, K. 2019. "Uso de promotores del crecimiento en cerdos". Available: <<https://laporcicultura.com/alimentacion-del-cerdo/promotores-del-crecimiento-en-cerdos/>> [Consulted: March 5, 2019].
- GRUPOR. 2017. Boletín Anual de indicadores productivos en la producción porcina en Cuba. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba.
- Hernández-García, J.E., Frizzo, L., Rodríguez-Fernández, J.C., Valdez-Paneca, G., Virginia-Zbrun, M., & Calero-Herrera, I. 2019. "Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77". *Revista de Salud Animal*, 41(1): 1-13, ISSN: 2224-4700.
- Instituto de Investigaciones Porcinas. 2008. Manual de procedimientos técnicos para la crianza porcina. Grupo de Producción Porcina, Ministerio de la Agricultura, La Habana, p. 84.
- Iñiguez-Palomares, C. 2007. Identificación de interacciones tipo adhesina-carbohidrato en la adherencia de *Lactobacillus* probióticos a la mucosa intestinal de lechones. PhD Thesis. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora, México. Available: <<https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/>>, [Consulted: December 2nd, 2019].
- Khare, A., Thorat, G., Bhimte, A. & Yadav, V. 2018. "Mechanism of action of prebiotic and probiotic". *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(4): 51-53, ISSN: 2320-7078.
- Kim, J., Kim, J., Kim, Y., Oh, S., Song, M., Hwan, J., Whang, K., Hyun, K. & Oh, S. 2018. "Influences of quorum-quenching probiotic bacteria on the gut microbial community and immune function in weaning pigs". *Animal Science Journal*, 89(2): 412-422, ISSN: 1740-0929, DOI: <https://doi.org/10.1111/asj.12954>.
- Levene, H. 1960. Robust tests for the equality of variance. *Contributions to Probability and Statistics*. 1st Ed. Ed. Stanford University Press, Palo Alto, California, USA, p. 278-292.
- Lu, X., Zhang, M., Zhao, L., Ge, K., Wang, Z., Jun, L. & Ren, F. 2018. "Growth performance and post-weaning diarrhea in piglets fed a diet supplemented with probiotic complexes". *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(11): 1791-1799, ISSN: 1738-8872, DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.1807.07026>.
- Markowiak, P. & Śliżewska, K. 2018. "The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition". *Gut Pathogens*, 10, 21, ISSN: 1757-4749, DOI: <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>.
- Milián, G. 2009. Obtención de cultivos de *Bacillus spp.* y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (*Gallus gallus domesticus*). PhD Thesis. Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, p. 100.
- Milián, G., Rodríguez, M., Díaz, D., Rondón, A.J., Pérez M.L., Bocourt R., Portilla, Y. & Beruvides, A. 2019. "Evaluation of the zootechnical additive SUBTILPROBIO® C-31 on feeding of laying hens in a commercial production unit". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 53(2): 161-168, ISSN: 2079-3480.
- Milián, G., Rondón, A.J., Pérez, M., Arteaga, F., Bocourt, R., Portilla, Y., Rodríguez, M., Pérez, Y., Beruvides, A. & Laurencio, M. 2017. "Methodology for the isolation, identification and selection of *Bacillus spp.* strains for the preparation of animal additives". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(2): 197-207, ISSN: 2079-3480.
- Nazef, L., Belguesmia, Y., Tani, A., Prévost, H. & Drider, D. 2008. "Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: evidence on anti-Campylobacter and anti-Listeria activities". *Poultry Science*, 87(2): 329-334, ISSN: 1525-3171, DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00282>.
- NRC (National Research Council). 2012. *Nutrients Requirements of Pigs*. 10th Ed. Ed. National Academy Press, Washington D.C., USA, p. 96, DOI: <https://doi.org/10.17226/6016>.
- Pérez, M. 2000. Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica. PhD Thesis. Universidad Agraria de La Habana, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, p. 100.
- Pieper, R., Janczyk, P., Schumann, R. & Souffrant, W.B. 2006. "The intestinal microflora of piglets around weaning-with emphasis on lactobacilli". *Archiva Zootechnica*, 9: 28-40, ISSN: 2344-4592.
- Plaza, J., Ruiz-Ojeda, F.J., Gil-Campos, M. & Gil, A. 2019. "Mechanisms of action of probiotics". *Advances in Nutrition*, 10(1): 49-66, ISSN: 2156-5376, DOI: <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>.
- Pluske, J.R., Kim, J.C. & Black, J.L. 2018. "Manipulating the immune system for pigs to optimise performance". *Animal Production Science*, 58(4): 666-680, ISSN: 1836-5787, DOI: <https://doi.org/10.1071/AN17598>.
- Price, R.J. & Lee, J.S. 1970. "Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli". *Journal of Milk and Food Technology*, 33(1): 13-18, ISSN: 0022-2747, DOI: <https://doi.org/10.4315/0022-2747-33.1.13>.
- Riboulet-Bisson, E., Sturme, M., Jeffery, I., O'Donnell, M., Neville, B., Forde, B., Claesson, M.; Harris, H., Gardiner, G., Casey, P., Lawlor, P., O'Toole, P. & Ross, R. 2012. "Effect of *Lactobacillus salivarius* bacteriocin Abp118 on the mouse and pig intestinal microbiota". *PLoS One*, 7(2): e31113, ISSN: 1932-6203, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031113>.
- Rondón, A.J., Milián, G., Arteaga, F., Samaniego, L.M., Bocourt, R., Lurencio, M., Rodríguez, M. & Pérez, M. 2018. "Probiotic effect of *Lactobacillus salivarius* on microbiological and immune indicators in chickens". *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 38(1): 21-26, ISSN: 1317-973X.
- Rondón, A.J. 2009. Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación

- integral de las respuestas de tipo probióticas provocadas en estos animales. PhD Thesis. Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, p. 100.
- Rondón, A.J., Milián, G., Arteaga, F.G., Bocourt, R., Ranilla, M.J., Riaño, J., Samaniego, L.M., Rodríguez, Z., Pérez, M. & Rodríguez, M. 2012. "Identification and antimicrobial activity of *Lactobacillus* strains of poultry origin". Cuban Journal of Agricultural Science, 46(4): 403-409, ISSN: 2079-3480.
- Segura, A. & De Bloss, M. 2000. La alternativa a los promotores del crecimiento. Memorias III Congreso Nacional de Avicultura. Centro de Convenciones Plaza América, Varadero, Cuba, p. 37-44.
- Shapiro, S. & Wilk, B. 1965. "An análisis of variante test for normalita (complete simples)". Biometrika, 52(3-4): 591-611, ISSN: 1464-3510, DOI: <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>.
- Timmerman, H.M., Koning, C.J.M., Mulder, L., Rombouts, F.M. & Beynen, A.C. 2004. "Monostrain, multistrain and multispecies probiotics: A comparison of functionality and efficacy". International Journal of Food Microbiology, 96(3): 219-233, ISSN: 0168-1605, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.012>.
- Yang, F., Hou, C., Zeng, X. & Qiao, S. 2015. The use of lactic acid bacteria as a probiotic in swine diets". Pathogens, 4(1): 34-45, ISSN: 2076-0817, DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens4010034>.
- Yeo, S., Lee, S., Park, H., Shin, H., Holzapfel, W. & Sung, H.Ch. 2016. "Development of putative probiotics as feed additives: validation in a porcine-specific gastrointestinal tract model". Applied Microbial and Cell Physiology, 100: 10043–10054. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7812-1>.
- Zhang, J., Deng, J., Wang, Z., Che, C., Li, Y. & Yang, Q. 2011. "Modulatory effects of *Lactobacillus salivarius* on intestinal mucosal immunity of piglets". Current Microbiology, 62: 1623-1631, ISSN: 1432-0991, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9906-4>.
- Zhang, W., Zhu, Y.H., Zhou, D., Wu, Q., Song, D., Dickved, J. & Wang, J.F. 2017. "Oral administration of a select mixture of Bacillus probiotics affects the gut microbiota and goblet cell function following *Escherichia coli* challenge in newly weaned pigs of genotype MUC4 that are supposed to be enterotoxigenic *E. coli* F4ab/ac receptor negative". Applied and Environmental Microbiology, 83(3): e02747-16, ISSN: 1098-5336, DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02747-16>.
- Zhao, P.Y. & Kim, I.H. 2015. "Effect of direct-fed microbial on growth performance, nutrient digestibility, fecal noxious gas emission, fecal microbial flora and diarrhea score in weanling pigs". Animal Feed Science and Technology, 200: 86–92, ISSN: 0377-8401, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.12.010>.

**Received: February 16, 2020**

**Accepted: July 6, 2020**