

Effect of efficient microorganisms, native to Guantánamo, Cuba, on bioproductive and hematological indicators of pre-fattening pigs

Efecto de microorganismos eficientes, autóctonos de Guantánamo, Cuba, en indicadores bioproductivos y hematológicos de precebas porcinas

A. Valdés¹, Yaneisy García², V.M. Álvarez¹, A. Samón³, E. Pérez⁴, J.O Serrano⁵, Y. Rodríguez⁴ and A. Berenguer¹

¹Facultad Agroforestal, Universidad de Guantánamo. Av. Che Guevara, km 1.5, Carretera Jamaica, CP. 95100, Guantánamo, Cuba.

²Instituto de Ciencia Animal. Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

³Empresa AZUMAT (Sucursal Guantánamo). Carretera Jamaica, km 5.0, CP. 95100, Guantánamo, Cuba.

⁴Facultad Agropecuaria, Universidad de Granma. Carretera Manzanillo, km 17 ½, Bayamo, CP. 85100, Granma, Cuba.

⁵Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón, km 9.0, CP. 65200, Ciego de Ávila, Cuba.

Email: alexvs@cug.co.cu

A. Valdés: <https://orcid.org/0000-0001-5265-045x>

Yaneisy García: <https://orcid.org/0000-0002-7055-4880>

V.M. Álvarez: <https://orcid.org/0000-0001-7855-188x>

A. Samón: <https://orcid.org/0000-0003-4372-5792>

E. Pérez: <https://orcid.org/0000-0001-5040-5493>

J.O. Serrano: <https://orcid.org/0000-0003-1710-6322>

Y. Rodríguez: <https://orcid.org/0000-0001-9072-7577>

A. Berengel: <https://orcid.org/0000-0002-7196-7396>

To evaluate the effect of efficient native Guantánamo microorganisms (MEAG) on bioproductive and hematological indicators of pre-fattening pigs, 60 pigs (Yorkshire-Landrace/Duroc), of 33 days old and average weight of 9.9 ± 1.31 kg, were used. They were distributed, according to a completely randomized design, into four groups, with 15 repetitions each. Treatments were control (without MEAG), and addition of MEAG, in doses of 1.0; 1.5 and 2.0 mL/kg of live weight/day, orally supplied. The experiment lasted 42 d. Final live weight, weight gain, daily mean gain, feed conversion, hemoglobin, hematocrit, total leukocyte, lymphocyte, eosinophil, neutrophil, monocytes, mortality and morbidity were evaluated. Final live weight of the animals that received 2.0 mL/kg of live weight/d was 3.09 kg higher than control ($P < 0.05$), and did not differ between doses. For weight gain, mean daily gain and dietary conversion, differences were only found between the highest evaluated dose and the remaining treatments. Animals of this group were superior to control by 3.06 kg of weight gain and 72.86 g of mean daily gain. In addition, they improved dietary conversion in 1.02 kg of consumed food/kg of weight gain. Hematological values increased with increasing doses, but within the normal range. For morbidity, differences were found between control and treated animals, without differences among the latter. It is concluded that the use of MEAG as a feed additive improves the bioproductive and hematological indicators of pre-fattening pigs.

Key words: pigs, microbial additive, productive response, health

The use of intensive animal production systems brings about imbalances in the productive performance of animals, which sometimes lead to the appearance of diseases (Nguyen and Nguyen 2017). Pre-fattening

Para evaluar el efecto de microorganismos eficientes autóctonos de Guantánamo (MEAG) en indicadores bioproductivos y hematológicos de precebas porcinas, se utilizaron 60 cerdos (Yorkshire-Landrace/Duroc) de 33 días, y peso promedio de 9.9 ± 1.31 kg. Se distribuyeron según diseño completamente aleatorizado en cuatro grupos, con 15 repeticiones cada uno. Los tratamientos fueron control (sin MEAG), y adición de MEAG, en dosis de 1.0; 1.5 y 2.0 mL/kg de peso vivo/día, suministradas vía oral. El experimento tuvo una duración de 42 d. Se evaluaron los indicadores peso vivo final, incremento de peso, ganancia media diaria, conversión alimentaria, hemoglobina, hematocrito, leucocitos totales, linfocitos, eosinófilos, neutrófilos, monocitos, mortalidad y morbilidad. El peso vivo final de los animales que recibieron 2.0 mL/kg de peso vivo/d fue superior en 3.09 kg con respecto al control ($P < 0.05$), y no difirió entre dosis. Para el incremento de peso, ganancia media diaria y conversión alimentaria solo se encontraron diferencias entre la mayor dosis evaluada y los restantes tratamientos. Los animales de este grupo superaron al control en 3.06 kg de incremento de peso y 72.86 g de ganancia media diaria. Además, mejoraron la conversión alimentaria en 1.02 kg alimento consumido/kg incremento de peso. Los valores hematológicos aumentaron al incrementar las dosis, pero en el rango normal. Solo para la morbilidad se hallaron diferencias entre los animales del control y los tratados, sin diferencias entre estos últimos. Se concluye que el uso de MEAG como aditivo alimenticio mejora los indicadores bioproductivos y hematológicos de precebas porcinas.

Palabras clave: cerdos, aditivo microbiano, respuesta productiva, salud.

La adopción de sistemas intensivos de producción animal trae consigo desajustes en el comportamiento productivo de los animales que, en ocasiones, propician la aparición de enfermedades (Nguyen y Nguyen 2017).

category constitutes one of the most critical stages of pigs. Weaning is a crucial event in its life cycle, frequently associated with severe enteric infections and the excessive use of growth-promoting antibiotics (Gresse *et al.* 2017). Hence, the efficient management of this event, and the subsequent fifteen days, are essential to achieve favorable productive results (Ayala *et al.* 2014).

Currently, an alternative to increase productive yield of animals is the use of additives in their daily diet, such as biocatalysts, enzymes, probiotics, essential oils and bioactive compounds from plants and seeds (Sathyabama *et al.* 2014 and Rodríguez *et al.* 2016). Efficient microorganisms (EM) are considered as one of the effective and sustainable alternatives for livestock production (Luna and Mesa 2016), as well as for sewage treatment and reduction of bad odors in the production of agrochemical-free food, among other multiple applications (Morocho and Leiva-Mora 2019). In general, MEs are defined as a mixed culture of beneficial microorganisms, without genetic manipulation, present in natural ecosystems and physiologically compatible with each other (Luna and Mesa 2016).

In Cuba, research centers, such as the Experimental Station of Pastures and Forages Indio Hatuey, in Matanzas province, and the University of Camagüey, developed mixtures of microorganisms from litter and other organic materials, obtained in areas free of the action of chemical fertilizers and herbicides, applied in pig production systems. These preparations produced beneficial effects on animal health and increases in zootechnical results (Rodríguez *et al.* 2013, Ojeda-García *et al.* 2016 and Blanco-Betancourt *et al.* 2017).

In the eastern provinces of Cuba, such as Guantánamo, scientific evidence regarding the development of efficient native microorganisms for pig farming is not sufficient. Therefore, the objective of this research was to evaluate the effect of efficient native microorganisms of Guantánamo on bioproductive and hematological indicators of pre-fattening pigs.

Materials and Methods

The research was carried out in the Unidad Porcina AZUMAT, located on the highway to Jamaica, in Manuel Tames municipality, Guantánamo province, with an epizootiology quadrant 102-147-17. Average rainfall regime is 746 mm/year, mean temperature is 25 °C and mean relative humidity is 77 %.

Experimental treatment and design. A completely randomized design was used, with 15 repetitions per treatment: control (without MEAG) and addition of MEAG, in doses of 1.0, 1.5 and 2.0 mL/kg of live weight per day, orally. Two pens were used per treatment, and each animal constituted an experimental unit.

La categoría de preceba constituye una de las etapas más críticas del cerdo. El destete es un suceso crucial en su ciclo de vida, frecuentemente asociado a infecciones entéricas severas y al uso excesivo de antibióticos promotores del crecimiento (Gresse *et al.* 2017). De ahí que el manejo eficiente de este evento, y los quince días posteriores, resulten esenciales para lograr resultados productivos favorables (Ayala *et al.* 2014).

En la actualidad, una alternativa para aumentar el rendimiento productivo en los animales es la utilización, en la ingesta diaria, de aditivos como biocatalizadores, enzimas, probióticos, aceites esenciales y compuestos bioactivos de plantas y semillas (Sathyabama *et al.* 2014 y Rodríguez *et al.* 2016). Los microorganismos eficientes (ME) se consideran una de las alternativas eficaces y sostenibles para la producción pecuaria (Luna y Mesa 2016), así como para el tratamiento de aguas negras y la reducción de malos olores en la producción de alimentos libres de agroquímicos, entre otras múltiples aplicaciones (Morocho y Leiva-Mora 2019). De forma general, los ME se definen como un cultivo mixto de microorganismos benéficos, sin manipulación genética, presentes en ecosistemas naturales, fisiológicamente compatibles unos con otros (Luna y Mesa 2016).

En Cuba, centros de investigación, como la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey, en la provincia de Matanzas, y la Universidad de Camagüey, desarrollaron mezclas de microorganismos a partir de hojarasca y otras materias orgánicas, obtenidas en zonas libres de la acción de abonos y herbicidas químicos, aplicados en los sistemas de producción porcina. Estos preparados produjeron efectos benéficos en la salud de los animales e incrementos en los resultados zootécnicos (Rodríguez *et al.* 2013, Ojeda-García *et al.* 2016 y Blanco-Betancourt *et al.* 2017).

En las provincias orientales de Cuba, como Guantánamo, no se informan evidencias científicas suficientes, en cuanto al desarrollo de microorganismos eficientes autóctonos para la porcicultura. De ahí que el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de microorganismos eficientes autóctonos de Guantánamo en indicadores bioproductivos y hematológicos de precebas porcinas.

Materiales y Métodos

La investigación se desarrolló en la Unidad Porcina AZUMAT, ubicada en la carretera a Jamaica, en el municipio Manuel Tames, en la provincia Guantánamo, con cuadrante epizootológico 102-147-17. El régimen de lluvias promedio es de 746 mm/año, la temperatura media es de 25 °C y la humedad relativa promedio de 77 %.

Diseño y tratamiento experimental. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con 15 repeticiones por tratamiento: control (sin MEAG) y adición de MEAG, en dosis de 1.0; 1.5 y 2.0 mL/kg de peso vivo al día, por vía oral. Se utilizaron dos corrales por tratamiento, y cada animal constituyó una unidad experimental.

Animales y sistema de alimentación y manejo. Se

Animals and feeding and management system. Sixty pre-fattening pig from Yorkshire-Landrace/Duroc cross were used, of both sexes (31 females and 29 castrated males), with an average age at weaning of 33 d, and an average live weight of 9.9 ± 1.31 kg. They were housed in Flat-Deck pens, with a 18 cm cement front, and a living space of 0.40 m² per individual. The provided diet was concentrated food with corn-soy bean meal, according to nutritional requirements for the pre-fattening category (Rostagno *et al.* 2017) and the Cuban technical procedures (IIP 2016). It was offered in hanging cone feeders, twice a day, at 7:00 a.m., before the corresponding doses of MEAG were provided to animals, and at 2:00 p.m. The mean intake of concentrate was 27.94 kg. Pigs were treated with MEAG during the 42 d of the experimental stage, and they were weighed weekly to adjust the applied dose. Water was supplied ad libitum in nipple drinkers. In addition, the vaccine against cholera was applied at 35 d of life of piglets.

Preparation and characteristics of MEAG. MEAG culture was prepared according to the methodology described by Tellez-Soria and Orberá-Ratón (2018), with the modifications described below. First, a solid product of lacto-fermentation was obtained, with the use of 30 kg of leaf litter in semi-decomposition and organic matter from the soil (1 to 6 cm from the surface), extracted from existing forests of Guantánamo province, in Cuba. This source was homogeneously mixed with 46 kg of corn meal, 10 L of sugar cane molasses and 10 L of whey. The mixture was deposited in a 200 L plastic tank, in 20 cm layers, and compacted to guarantee anaerobic conditions. The tank was hermetically closed, a valve was placed for releasing gases generated during fermentation and it was located in a warehouse with room temperature (28 ± 2 °C) for 21 d. Later, a liquid fermentation was performed under the same temperature conditions for 7 d. For this, 10 kg of solid inoculum were taken, placed on a sieve and in a 200-L plastic tank, containing the mixture of 10 L of molasses, 10 L of whey and a sufficient quantity of drinking water without chlorine. After the fermentation time, a product with a sweet and sour odor was obtained,

utilizaron 60 precebas porcinas del cruce Yorkshire-Landrace/Duroc, de ambos sexos (31 hembras y 29 machos castrados), con edad promedio al destete de 33 d, y peso vivo promedio de 9.9 ± 1.31 kg. Se alojaron en corrales tipo Flat-Deck, con frente de cemento de 18 cm, y espacio vital de 0.40 m² por individuo. La dieta suministrada fue alimento concentrado con harinas de maíz-soya, según requerimientos nutricionales para la categoría preceba (Rostagno *et al.* 2017) y los procedimientos técnicos cubanos (IIP 2016). Se ofreció en comederos tolva, dos veces por día, a la 7:00 a.m., antes de suministrar las dosis correspondientes de MEAG a los animales, y a la 2:00 p.m. El consumo promedio de concentrado fue de 27.94 kg. Los cerdos se trataron con MEAG durante los 42 d que duró la etapa experimental, y se pesaron semanalmente para ajustar la dosis aplicada. El agua se suministró ad libitum en bebederos tipo tetinas. Además, se aplicó la vacuna contra el cólera a los 35 d de vida de los cerditos.

Preparación y características de los MEAG. El cultivo de MEAG se elaboró según la metodología descrita por Tellez-Soria y Orberá-Ratón (2018), con las modificaciones que se describen seguidamente. Primero se obtuvo un lactofermento sólido, con la utilización de 30 kg de hojarasca en semidescomposición y materias orgánicas del suelo (1 a 6 cm de la superficie), extraídas de bosques vigentes de la provincia Guantánamo, en Cuba. Esta fuente se mezcló homogéneamente con 46 kg de harina de maíz, 10 L de melaza de caña de azúcar y 10 L de suero lácteo. La mezcla se depositó en un tanque plástico de 200 L, en capas de 20 cm, y se compactó para garantizar condiciones de anaerobiosis. El tanque se cerró herméticamente, se le colocó una válvula para el escape de los gases generados durante la fermentación y se ubicó en una nave con temperatura ambiental (28 ± 2 °C) durante 21 d. Posteriormente, se realizó una fermentación líquida en iguales condiciones de temperatura durante 7 d. Para ello se tomaron 10 kg del inóculo sólido, se colocó en una malla y se depositó en un tanque plástico de 200 L de capacidad, que contenía la mezcla de 10 L de melaza, 10 L de suero lácteo y cantidad suficiente de agua potable no clorada. Transcurrido el tiempo de fermentación, se obtuvo un producto con olor

Table 1. Microbiological characteristics and pH of the evaluated MEAG in pre-fattening pigs¹

Indicator	Reference	Mean (n=3)	SD	CV, %
Viable yeast, CFU/mL	NC-ISO 1004:2016	1.6x10 ¹⁰	0.16	9.88
Filamentous fungi, CFU/mL		2.7x10 ⁶	0.18	6.68
Total and fecal coliforms, CFU/mL	NC-ISO 4831:2010	Negative	---	---
Salmonella in 25 mL, CFU/mL	NC-ISO 6579:2008	Negative	---	---
Lactic acid bacteria, CFU/mL (through the method of serial dilutions and cultivation in Petri dishes with MRS agar medium, incubated 24-72 h at 37 °C)		4.2x10 ⁹	0.38	9.07
pH (measured with a digital CRISON® Basic 20,40*H 110 pHmeter, USA)		3.40	0.06	1.86

CFU: colony forming unit

¹Analyses conducted to homogeneous samples out of the three tanks at the Laboratorio Provincial de Diagnóstico Veterinario, with the use of Cuban regulations (NC) and by triplicate

SD: standard deviation

CV: Coefficient of variation

typical of lactic fermentations, and its characteristics are shown in table 1. For evaluating MEAG in pigs, three tanks were prepared at the same time (total capacity 600 L), which were kept in the previously mentioned warehouse during the experiment.

Experimental procedure for evaluating the effect of MEAG. The evaluated indicators were final live weight (FL), weight gain (WG), daily mean gain (DMG), food conversion (FC), hemoglobin, hematocrit, total leukocytes, lymphocytes, eosinophils, neutrophils, monocytes, morbidity, mortality and its causes.

FL of animals was quantified after 42 d of experimentation on a Salter scale, with a capacity of 50 kg and ± 0.01 kg precision.

WG was calculated by the difference between the FL and initial live weight (IL). This is:

$$WG = FL - IL$$

To determine DMG, the formula $DMG = (FL - IL) /$ evaluation time, was applied.

FC was obtained from the formula $FC = \text{kg of consumed DM} / \text{kg of live weight increase}$.

During the experimental stage, the number of animals with diarrheal syndromes or dead animals was recorded, in order to determine the proportion of morbidity and mortality.

At the end of the experimentation, six animals were randomly selected per each treatment, and blood was extracted from the orbital vein with California-type needles. Samples were deposited in tubes impregnated with disodium EDTA (1.0 mg/mL of blood) and transferred to the Laboratorio Provincial de Diagnóstico Veterinario for their processing, according to the methodology described by Coffin (1966).

Statistical analysis. Experimental data was processed with the IBM SPSS program, version 22. A simple analysis of variance (ANOVA) was carried out, with previous verification of variance homogeneity using Levene (1960) contrast test on the equality of error variances. Differences among means were found with Duncan (1955) multiple range test for $P \leq 0.05$. For morbidity and mortality indicators due to digestive disorders and viability, an analysis of multiple proportions was performed using Chi-square test (χ^2), with a significance level of $P \leq 0.05$. Magnitudes of differences between proportions were shown in a graphical analysis of the ANOM mean.

Results and Discussion

Table 2 shows the results of productive indicators of pre-fattening pigs with the addition of MEAG, after 42 d of experimentation. Differences ($P \leq 0.05$) were found between treatments for these indicators. FL of animals that received 2.0 mL MEAG/kg of body weight was 3.09 kg higher than control group, and did not differ among the applied doses. For the WG, DMG and FC, only differences were found between the highest evaluated dose and the remaining treatments. Animals in

agridulce, propio de las fermentaciones lácticas, cuyas características se muestran en la tabla 1. Para la evaluación de los MEAG en los cerdos se prepararon, a la vez, tres tanques (capacidad total 600 L), que se mantuvieron en la nave antes mencionada durante el experimento.

Procedimiento experimental para la evaluación del efecto de MEAG. Los indicadores evaluados fueron peso vivo final (PF), incremento de peso (IP), ganancia media diaria (GMD), conversión alimentaria (CA), hemoglobina, hematocrito, leucocitos totales, linfocitos, eosinófilos, neutrófilos, monocitos, morbilidad, mortalidad y sus causas.

El PF de los animales se cuantificó a los 42 d de experimentación en una balanza Salter, con capacidad de 50 kg y precisión ± 0.01 kg.

El IP se calculó por la diferencia entre el PF y peso vivo inicial (PI). Esto es: $IP = PF - PI$

Para determinar la GMD se aplicó la fórmula $GMD = (PF - PI) / \text{tiempo de la evaluación}$

La CA se obtuvo a partir de la fórmula $CA = \text{kg de MS consumido} / \text{kg de incremento de peso vivo}$

Durante la etapa experimental, se registró el número de animales con síndromes diarreicos o animales muertos, con el propósito de determinar la proporción de morbilidad y mortalidad.

Al final de la experimentación, se seleccionaron al azar seis animales de cada tratamiento, y se les extrajo sangre de la vena orbital, con agujas tipo California. Las muestras se depositaron en tubos impregnados con EDTA disódico (1.0 mg/mL de sangre) y se trasladaron para su procesamiento en el Laboratorio Provincial de Diagnóstico Veterinario, según la metodología descrita por Coffin (1966).

Análisis estadístico. Los datos experimentales se procesaron con el programa IBM SPSS, versión 22. Se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA), con previa comprobación de la homogeneidad de varianza mediante la prueba de contraste de Levene (1960) sobre la igualdad de las varianzas error. Las diferencias entre medias se hallaron con el test de rangos múltiples de Duncan (1955) para $P \leq 0.05$. Para los indicadores morbilidad y mortalidad por trastornos digestivos y viabilidad, se realizó un análisis de proporciones múltiples mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2), con nivel de significación de $P \leq 0.05$. Las magnitudes de las diferencias entre las proporciones se mostraron en un análisis gráfico de media ANOM.

Resultados y Discusión

La tabla 2 muestra los resultados de los indicadores productivos de las precebas porcinas con la adición de MEAG, después de 42 d de experimentación. Se encontraron diferencias ($P \leq 0.05$) entre tratamientos para estos indicadores. El PF de los animales que recibieron 2.0 mL MEAG/kg de peso vivo fue superior en 3.09 kg al grupo control, y no difirió entre las dosis aplicadas. Para el IP, GMD y CA, solo se hallaron diferencias entre la mayor dosis evaluada y los tratamientos restantes. Los

this group were superior to control by 3.06 kg of weight gain and 72.86 g of DMG, and improved the FC by 1.02 kg of consumed food/kg of weight gain.

animales de este grupo superaron al control en 3.06 kg de incremento de peso y 72.86 g de GMD, y mejoraron la CA en 1.02 kg alimento consumido/kg incremento de peso.

Table 2. Effect of adding MEAGs on productive indicators of pre-fattening pigs of 75 d old

Indicators	Control	MEAG doses, mL/kg of live weight			SE ±	P Value
		1.0	1.5	2.0		
Final weight, kg	19.60 ^b	20.22 ^{ab}	20.85 ^{ab}	22.69 ^a	0.43	0.046
Weight gain, kg	9.70 ^b	10.27 ^b	10.87 ^b	12.76 ^a	0.33	0.005
Daily mean gain, g	230.95 ^b	244.60 ^b	258.73 ^b	303.81 ^a	8.11	0.005
Food conversion, kg/kg	3.25 ^a	2.97 ^a	2.64 ^a	2.23 ^b	0.13	0.040

^{a,b} Means with different letters in the same line differ at P < 0.05 (Duncan 1955)

The previous results can be mainly related to the criteria of Beruvides *et al.* (2018) about the action of zootechnical additives on intestinal microbial ecosystem, health and productive indicators of animal. This action is attributed to the presence of viable microorganisms, organic acids, digestive enzymes and antimicrobial substances present in the additives, which favorably influence on the maintenance of microbiome eubiosis, improve intestinal health, increase absorptive, digestive and fermentative processes, and favor the synthesis of deficient nutrients in the diet. In addition, with a multifactorial approach, the aforementioned effects promote a better health state in the animal, better food conversion, increase of live weight and meat yield. Other authors also found similar effects when applying additives with mixed cultures of lactic bacteria and yeast in different categories of pigs (Flores-Manchero *et al.* 2016, 2017 and Miranda-Yuquilema *et al.* 2018 a, b).

Variability of intergroup effect could be related to dose and application method of MEAG, as reported for microbial additives by Sosa *et al.* (2018). It is possible that the application of additive per kg of body weight favored a more effective action, by using larger volumes of the preparation. This, in turn, could influence on the increase of the number of viable microbial cells in the intestinal lumen, with possible colonization or modification of intestinal microbiome composition. This effect was observed by Kiros *et al.* (2018) and Kiros *et al.* (2019). The effectiveness, according to Delgado *et al.* (2014), is only achieved when the quorum required to reach the intestine, colonize and express the own benefits of these products is added to the individual or collective stimulating potential of microorganisms involved.

Blanco-Betancourt *et al.* (2017) observed similar results to those of this study. These authors used doses of 40, 80 and 120 mL/pig/d of EM preparation, IHplus®, obtained by a similar technology, but with inoculum from their Matanzas locality. These authors found the best results with the last doses compared to control, and reported that the dose of 40 mL/pig/d had no incidence on productive indicators. This is possibly due

Los resultados anteriores se pueden relacionar, fundamentalmente, con los criterios de Beruvides *et al.* (2018) acerca de la acción que ejercen los aditivos zootécnicos en el ecosistema microbiano intestinal, salud e indicadores productivos de los animales. Esta acción se atribuye a la presencia de microorganismos viables, ácidos orgánicos, enzimas digestivas y sustancias antimicrobianas presentes en los aditivos, que inciden favorablemente en el mantenimiento de la eubiosis del microbioma, mejoran la salud intestinal, incrementan los procesos absorptivos, digestivos y fermentativos, y favorecen la síntesis de nutrientes deficientes en la dieta. Además, con un enfoque multifactorial, los efectos mencionados propician mejor estado de salud en el animal, mejor conversión del alimento, incremento del peso vivo y rendimiento cárnico. Otros autores también encontraron efectos similares al aplicar aditivos con cultivos mixtos de bacterias lácticas y levaduras en diferentes categorías de cerdos (Flores-Manchero *et al.* 2016, 2017 y Miranda-Yuquilema *et al.* 2018 a,b).

La variabilidad del efecto intergrupual pudo estar relacionada con la dosis y modo de aplicación de los MEAG, según lo informado para aditivos microbianos por Sosa *et al.* (2018). Quizás, la aplicación del aditivo por kg de peso vivo propició una acción más efectiva, al emplear mayores volúmenes del preparado. Esto, a su vez, pudo influir en el incremento del número de células microbianas viables en el lumen intestinal, con posible colonización o modificación de la composición del microbioma intestinal, efecto observado por Kiros *et al.* (2018) y Kiros *et al.* (2019). La efectividad, según Delgado *et al.* (2014), solo se alcanza cuando a la potencialidad estimulante individual o colectiva de los microorganismos involucrados se suma el quorum requerido para llegar al intestino, colonizar y expresar los beneficios propios de estos productos.

En investigaciones como las de Blanco-Betancourt *et al.* (2017) se observaron resultados similares a los de este estudio. Estos autores utilizaron dosis de 40, 80 y 120 mL/cerdo/d del preparado de ME, IHplus®, obtenido por una tecnología semejante, pero con inóculo de su localidad matancera. Estos autores encontraron los mejores resultados con las últimas dosis respecto al control, y refirieron que la dosis de 40 mL/cerdo/d no

to the effect of low concentration of microorganisms, and to the transit speed of digesta that, at early ages, is very fast, and does not favor the conditions for colonization of these microorganisms in the digestive system.

Hematological indicators of animals treated with MEAG are presented in table 3. Their values increased as the preparation dose increased, although all were found within the reference ranges considered as normal, as reported by Serem *et al.* (2017). Similar effects were found by Dlamini *et al.* (2017) and Trevisi *et al.* (2017), who informed that lactic acid bacteria and yeasts increased digestion and absorption of the main nutrients (amino acids, vitamins, minerals and some others). This causes an increase of availability of iron in the animal and favors the central nucleus of hemoglobin, by joining with some amino acids and vitamins. Therefore, the health of the host is positively influenced.

tuvo incidencia en los indicadores productivos. Esto se debe, posiblemente, al efecto de la baja concentración de microorganismos, y a la velocidad de tránsito de la digesta que, a edades tempranas, es muy rápida, y no favorece las condiciones para la colonización de estos microorganismos en el sistema digestivo.

Los indicadores hematológicos de los animales tratados con MEAG se presentan en la tabla 3. Sus valores aumentaron al incrementar la dosis del preparado, aunque todos se encontraron en los rangos de referencia considerados como normales, según lo informado por Serem *et al.* (2017). Efectos similares a estos encontraron Dlamini *et al.* (2017) y Trevisi *et al.* (2017), quienes informaron que las bacterias ácido lácticas y levaduras incrementan la digestión y la absorción de los principales nutrientes (aminoácidos, vitaminas, minerales, entre otros), lo que provoca aumento de la disponibilidad del hierro en el animal y favorece el núcleo central de la hemoglobina, al unirse con algunos

Table 3. Effect of adding MEAGs on blood indicators of pre-fattening pigs with 75 d old

Indicators	RR	Control	MEAG doses, mL/kg			SE±	P Value
			1.0	1.5	2.0		
Hematocrit, %	24.0-45.00	30.33 ^b	31.67 ^b	35.83 ^a	36.00 ^a	0.71	0.001
Hemoglobin, g/dL	9.04-16.54	10.08 ^b	10.52 ^b	11.92 ^a	11.97 ^a	0.23	0.001
Total leucocytes, x109/L	2.55-20.0	8.75 ^d	10.75 ^c	13.83 ^b	16.30 ^a	0.66	0.000
Eosinophils, x109/L	0.10-2.70	0.38 ^b	0.58 ^b	0.93 ^a	1.13 ^a	0.07	0.000
Neutrophils, x109/L	0.00-4.80	2.88 ^c	3.40 ^b	3.65 ^b	4.25 ^a	0.12	0.000
Lymphocytes, x109/L	3.50-9.50	4.33 ^b	4.55 ^b	4.66 ^b	6.02 ^a	0.20	0.006
Monocytes, x109/L	0.00-1.60	0.42 ^c	0.45 ^c	0.62 ^b	0.90 ^a	0.05	0.000

^{a,b,c,d} Means with different letters in the same line differ at P < 0.05 (Duncan 1955)

RR: referential ranges by Serem *et al.* (2017)

The improvement of nonspecific defense mechanisms of the host, and the stimulation of the production of blood cells related to adaptive or innate immune response (Herrera *et al.* 2016), without this action being exaggerated or harmful to the host, are others of the effects associated with microbial additives. It is also possible that, by interacting with antigens, cells secrete pro and anti-inflammatory cytokines, which regulate the function of regulatory T cells. This allows achieving an effective immune system, and decreases susceptibility to various inflammations and allergies (Laskowska *et al.* 2017 and Madrid *et al.* 2019). It is possible that this immunomodulatory and protective effect is produced by MEAG in pigs that consumed doses of 1.5 and 2.0 mL/kg of body weight/d, and can also be related to results of morbidity and mortality indicators, shown in table 4.

For morbidity, the proportion differed between animals of control group and those treated with MEAG, without differences among evaluated doses. Meanwhile, for mortality, no differences were found. Digestive disorders were death cause of animals of control group and with the applied dose of 1.0 mL of MEAG/kg of

aminoácidos y vitaminas. Como consecuencia, influye positivamente en la salud del huésped.

La mejora de los mecanismos de defensa inespecíficos del huésped, y la estimulación de la producción de células sanguíneas relacionadas con la respuesta inmune innata o adaptativa (Herrera *et al.* 2016), sin que esta acción resulte exagerada o perjudicial para el huésped, son otros de los efectos asociados a los aditivos microbianos. También es posible que, al interactuar con los antígenos, las células segreguen citoquinas pro y antiinflamatorias, que regulan la función de las células T reguladoras. Esto permite alcanzar un sistema inmunológico eficaz, y disminuye la susceptibilidad a diversas inflamaciones y alergias (Laskowska *et al.* 2017 y Madrid *et al.* 2019). Quizás, este efecto inmunomodulador y protector lo producen los MEAG en los cerdos que consumieron las dosis de 1.5 y 2.0 mL/kg de peso vivo/d, y se puede relacionar también con los resultados de los indicadores de morbilidad y mortalidad que muestra la tabla 4.

Para la morbilidad, la proporción difirió entre los animales del grupo control y los tratados con MEAG, sin diferencias entre las dosis evaluadas. En tanto, para la mortalidad no se encontraron diferencias. Los trastornos

Table 4. Proportion of health indicators of evaluated animal groups

Indicator	Treatments	Number of animals	Proportion	SE ±	χ^2	P Value
Morbidity	Control	10	0.67 ^b	0.07	10.05	0.018
	T1	6	0.40 ^a			
	T2	4	0.27 ^a			
	T3	2	0.13 ^a			
Mortality	Control	1	0.06	0.02	2.07	0.558
	T1	1	0.06			
	T2	0	0.00			
	T3	0	0.00			

^{a, b} Proportions with different letters in the same column differ at $P < 0.05$

T1, T2 and T3 doses of 1.0, 1.5, 2.0 mL MEAG/kg of live weight/d, respectively

χ^2 : Chi-square value

live weight/day.

According to the research, it could be affirmed that pigs treated with the mixed culture of MEAG showed fast adaptation to weaning challenges. Similar results were reported by Miranda-Yuquilema *et al.* (2018a), when using biopreparations with *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*, at doses of 2.5 mL/animal/d in the diet of post-weaning pigs. These authors observed that treated animals presented the least number of diarrheal disorders and deaths with respect to control ($P < 0.05$).

Barreto *et al.* (2015) also evaluated the action of a mixed culture of EM, with inoculum from Camagüey, Cuba, for controlling and preventing pig diarrheas. Authors highlighted the role of lactic bacteria in blocking ligands for enteropathogens, which is an essential step that promotes colonization and subsequent release of enterotoxins. They also pointed out that these mixed cultures can modify the pH in the intestinal lumen ($\text{pH} < 4.0$), which do not tolerate certain enteropathogens, due to the production of organic acids (especially lactic acid) and short-chain fatty acids (acetate, propionate and butyrate). In addition, the production of antimicrobial substances such as nisin and lactalin, as well as the production of hydrogen peroxide, may contribute to the action.

From the exposed results, it is concluded that the use of MEAG as a feed additive improves bioproductive and hematological indicators of pre-fattening pigs, with superior results, when using the dose of 2.0 mL/kg of live weight/d.

Acknowledgements

Thanks to the management of AZUMAT Pig Unit, in Guantánamo, and its workers. Likewise, gratitude is expressed to Eng. Keylis Grandales Llanes, without whose collaboration the research would not have been possible.

digestivos fueron la causa de muerte de los animales en el control y con la dosis aplicada de 1.0 mL de MEAG/kg de peso vivo/día.

De acuerdo con la investigación, se podría afirmar que los lechones tratados con el cultivo mixto de MEAG mostraron rápida adaptación a los desafíos del destete. Resultados similares notificaron Miranda-Yuquilema *et al.* (2018a), al utilizar biopreparados con *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces fragilis*, en dosis de 2.5 mL/animal/d en la dieta de cerdos pos-destete. Estos autores observaron que los animales tratados fueron los que presentaron menor número de trastornos diarreicos y muertes con respecto al control ($P < 0.05$).

También Barreto *et al.* (2015) evaluaron la acción de un cultivo mixto de ME, con inóculo de la zona camagüeyana de Cuba, en el control y prevención de las diarreas de cerdos. Los autores destacaron la función de las bacterias lácticas en el bloqueo de ligandos para enteropatógenos, paso imprescindible que propicia la colonización y ulterior liberación de enterotoxinas. Además, señalaron que estos cultivos mixtos pueden modificar el pH en el lumen intestinal ($\text{pH} < 4.0$), que no toleran determinados enteropatógenos, debido a la producción de ácidos orgánicos (en especial ácido láctico) y ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato). Además, pueden contribuir en la acción la producción de sustancias antimicrobianas como nisina y lactalina, así como la producción de peróxido de hidrógeno.

A partir de los resultados expuestos, se concluye que el uso de MEAG como aditivo alimenticio mejora los indicadores bioproductivos y hematológicos de precebas porcinas, con resultados superiores, al utilizar la dosis de 2.0 mL/kg de peso vivo/d.

Agradecimientos

Se agradece a la dirección de la Unidad Porcino AZUMAT, en Guantánamo, y a sus trabajadores. Igualmente, se expresa gratitud a la Ing. Keylis Grandales Llanes, sin cuya colaboración no habría sido posible la realización de la investigación

References

- Ayala, L., Bocourt, 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): 133-136, ISSN: 2079-3480.
- Barreto, G., Rodríguez, H., Bertot, J.A. & Delgado, R. 2015. "Microorganismos autóctonos multipropósitos (MAM) para el control y prevención de la colibacilosis neonatal porcina". Revista de Producción Animal, 27(2): 16-19, ISSN: 2224-7920.
- Beruvides, A., Elías, A., Valiño, E.C., Milián, G., Lezcano, Y., Moliner, J.L., Rodríguez, M. & Zamora, H. 2018. "Evaluation of the zootechnical additive VITAFERT in the productive performance and health of pre-fattening piglets". Cuban Journal of Agricultural Science, 52(1): 49-56, ISSN: 2079-3480.
- Blanco-Betancourt, D., Ojeda-García, F., Cepero-Casas, L., Estupiñan-Carrillo, L.J., Álvarez-Núñez, L.M., & Martín-Martín, G.J. 2017. "Efecto del bioproducto IHplus® en los indicadores productivos y de salud de precebas porcinas". Pastos y Forrajes, 40(3): 201-205, ISSN: 2078-8452.
- Coffin, D.L. 1966. Laboratorio clínico en Medicina Veterinaria. La Habana, Cuba, p. 335.
- Delgado, R., Barreto, G. & Rodríguez, H. 2014. "La antibiosis, génesis y componente de los probióticos; dos conceptos impecederos. Nota técnica". Revista de Producción Animal, 26(3): 51-53, ISSN: 2224-7920.
- Dlamini, Z.C., Langa, R.L.S., Aiyegoro, O.A. & Okoh, A.I. 2017. "Effects of probiotics on growth performance, blood parameters, and antibody stimulation in piglets". South African Journal of Animal Science, 47(6): 766-775, ISSN: 2221-4062, DOI: <https://doi.org/10.4314/sajas.v47i6.4/>.
- Duncan, D.B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". Biometrics, 11(1): 1-42, ISSN: 0006-341X, DOI: <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- Flores-Mancheno, L.G., García-Hernández, Y., Caicedo-Quinche, W.O. & Usca-Méndez, J.E. 2017. "Influencia de dos aditivos en la respuesta productiva y sanitaria de cerdos en crecimiento-ceba". Revista Ciencia y Agricultura, 14(1): 65-73, ISSN: 2539-0899, DOI: <https://doi.org/10.19053/01228420.v14.n1.2017.6089>.
- Flores-Mancheno, L.G., García-Hernández, Y., Usca-Méndez, J.E. & Caicedo-Quinche, W.O. 2016. "Estudio comparativo de tres aditivos zootécnicos en el comportamiento productivo y sanitario de cerdos en el período post-destete". Revista Ciencia y Agricultura, 13(2): 95-105, ISSN: 2539-0899, DOI: <https://doi.org/10.19053/01228420.v13.n2.2016.5557>.
- Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M.A., Van de Wiele, T., Forano, E. & Blanquet-Diot, S. 2017. "Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health". Trends in Microbiology, 25(10): 851-873, ISSN: 0966842X, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.004>.
- Herrera, V.H., Ciro, J. & Parra, J. 2016. "Adición de Enterococcus faecium mejora poblaciones celulares inmunes y anticuerpos vacunales de lechones destetos". Revista Lasallista de Investigación, 13(2): 116-127, ISSN: 2256-3938, DOI: <https://doi.org/10.22507/rli.v13n2a11>.
- IIP. 2016. Manual de procedimientos técnicos para la crianza porcina. Instituto de Investigaciones Porcinas (IIP). Ed. EDIPORC, La Habana, p. 45-48, ISBN: 978-959-7208-27-7
- Kiros, T.G., Derakhshani, H., Pinloche, E., D'Inca, R., Marshall, J., Auclair, E., Khafipou, E. & Van Kessel, A. 2018. "Effect of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* (ActisafSc 47) supplementation on the performance and hindgut microbiota composition of weanling pigs". Scientific Reports, 8: 5315, ISSN: 2045-2322, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23373-8>.
- Kiros, T.G., Luise, D., Derakhshani, H., Petri, R., Trevisi, P., D'Inca, R., Auclair, E. & Van Kessel, A.G. 2019. "Effect of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on the performance and cecum microbial profile of suckling piglets". PLoS One, 14(7): e0219557, ISSN: 1932-6203, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219557>.
- Laskowska, E., Jarosz, Ł. & Grądzki, Z. 2017. "The effect of feed supplementation with effective microorganisms (EM) on pro- and anti-inflammatory cytokine concentrations in pigs". Research in Veterinary Science, 115: 244-249, ISSN: 0034-5288, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.008>.
- Levene, H. 1960. Robust tests for equality of variances. In: Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling. Ingram Olkin, Sudhist G. Ghurye, Wassily Hoeffding, William G. Madow, and Henry B. Mann (eds.). Ed. Stanford University Press, Oxford, U.K., p. 278-292, ISBN: 9780804705967.
- Luna, M.A., & Mesa, J.R. 2016. "Microorganismos eficientes y sus beneficios para los agricultores". Agroecosistemas, 4(2): 31-40, ISSN: 2415-2862.
- Madrid, T.A., Herrera, V.H., Patiño, F., Gómez, A. & Parra, J. 2019. Cambios en las poblaciones de células inmunes sanguíneas de cerdos en crecimiento alimentados con probióticos. In: Memorias VIII Seminario Internacional Porcicultura Tropical, La Habana, Cuba.
- Miranda-Yuquilema, J.E., Marin-Cárdenas, A. & García-Hernández, Y. 2018b. "Repercussion of microbial additive on the productive, zoometric and diarrheal incidences of piglets". Revista MVZ Córdoba, 23(2): 6617-6627, ISSN: 1909-0544, DOI: <https://doi.org/10.21897/rmvz.1335>.
- Miranda-Yuquilema, J.E., Marin, A. & González, M. 2018a. "El comportamiento bioproductivo de cerdas reproductoras y su descendencia alimentadas con aditivo probiótico". Revista de Ciencias Agrícolas, 35(1): 69-81, ISSN: 2256-2273, DOI: <https://doi.org/10.22267/rcia.183501.84>.
- Morocho, M.T. & Leiva-Mora, M. 2019. "Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas". Centro Agrícola, 46(2): 93-103, ISSN: 2072-2001.
- NC-ISO 1004: 2016. 2016. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de levaduras y mohos, técnica a 25 °C. Oficina Nacional de Normalización, La Habana. Cuba, p. 5.
- NC-ISO 4831:2010. 2010. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Método horizontal para la detección y

- enumeración de coliformes Técnica del número más probable (ISO 4831: 2006). Oficina Nacional de Normalización, La Habana, Cuba, p. 5.
- NC-ISO 6579:2008. 2008. Método Horizontal para la Detección de *Salmonella spp.* Oficina Nacional de Normalización, La Habana, Cuba, p. 6.
- Nguyen, T.T. & Nguyen, C.H. 2017. "Effects of inclusion of protein hydrolysis from Tra catfish by-product waste water in the diets on apparent ileal digestibility and total tract retention coefficients of local chickens". *Livestock Research for Rural Development*, 29(3): 55-60, ISSN: 0121-3784, Available: <<http://www.lrrd.org/lrrd29/3/nthi29055.html>>.
- Ojeda-García, F., Blanco-Betancourt, D., Cepero-Casas, L. & Izquierdo-Rosales, M. 2016. "Efecto de la inclusión de un biopreparado de microorganismos eficientes (IHplus®) en dietas de cerdos en ceba". *Pastos y Forrajes*, 39(2): 119-124, ISSN: 0864-0394, ISSN: 2078-8452.
- Rodríguez, H.C., Barreto, G., Bertot, A. & Vázquez, R. 2013. "Los microorganismos eficientes como promotores del crecimiento en los cerdos hasta el destete". *REDVET Revista Electrónica de Veterinaria*, 14(9), ISSN 1695-7504.
- Rodríguez, J., Méndez, V., Calero, I., Peña, K., Martos, D. & Kukurtcu, B. 2016. "Evaluation of the nutritional supplement VIUSID vet powder on the productive behaviour of sows and boars". *Journal of Environmental Science and Engineering*, 5: 432-439, ISSN: 0367-827X, DOI: <https://doi.org/10.17265/2162-5263/2016.09.005>.
- Rostagno, H.S., Teixeira, L.F., Hannas, M.I., Lopes, J., Kazue, N., Guilherme, F., Saraiva, A., Texeira, M.L., Borges, P., de Oliveira, R.F., de Toledo, S.L. & de Oliveira, C. 2017. *Tablas Brasileñas para Aves y Cerdos - Composición de Alimentos y Requerimientos Nutricionales*. Ed. Departamento de Zootecnia, Universidad Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, p. 403-404, ISBN: 978-85-8179-122-7.
- Sathyabama, S., Ranjith-Kumar, M., Brunthadevi, P., Vijayabharathi, R. & Brindha, V. 2014. "Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment". *LWT-Food Science and Technology*, 57(1): 419-425, ISSN: 0023-6438, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.024>.
- Serem, J.K., Wahome, R.G., Gakuya, D.W., Kiama, S.G., Gitao, G.C. & Onyango, D.W. 2017. "Growth performance, feed conversion efficiency and blood characteristics of growing pigs fed on different levels of *Moringa oleifera* leaf meal". *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 9(11): 327-333, ISSN: 2141-2529, DOI: <https://doi.org/10.5897/JVMAH2017.0570>.
- Sosa, D., García, Y. & Dustet, J.C. 2018. "Development of probiotics for animal production. Experiences in Cuba". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 52(4): 1-17, ISSN: 2079-3480.
- Tellez-Soria, T. & Orberá-Ratón, T. 2018. "Efecto estimulador del crecimiento de dos biopreparados biotecnológicos en cultivos de remolacha (*Beta vulgaris* L.)". *Revista Cubana de Química*, 30(3): 483-494, ISSN: 2224-5421.
- Trevisi, P., Latorre, R., Priori, L.D., Archetti, I. & Mazzoni, M. 2017. "Effect of feed supplementation with live yeast on the intestinal transcriptome profile of weaning pigs orally challenged with *Escherichia coli* F4". *Animal*, 11(1): 33-34, ISSN: 1751-732X, DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731116001178>.

Received: June 6, 2020

Accepted: July 8, 2020