



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

INHIBICION DE ACCION ENTEROTOXICA
DEL E. coli, Y DE SU CRECIMIENTO POR
ACIDIFICANTES BIOLÓGICOS
Y VEGETALES

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
VERONICA LETICIA MARQUEZ CODINA

Director de Tesis:
M. C. Clara Inés Álvarez Manrique



FALLA DE ORIGEN
Cuautilán Izcalli, Estado de México

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

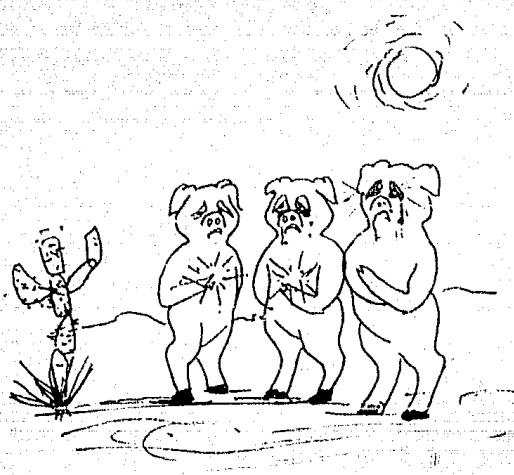
Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

1.0	INTRODUCCION	1
1.1	Generalidades	1
1.2	Diarrea y mecanismos de acción	3
1.21	Causas de diarrea:	5
1.22	Prevención y control de diarreas	7
1.3	Acidificantes biológicos	7
1.31	Tipos de probióticos disponibles	8
1.32	Lactobacillus	13
1.33	Clasificación	13
1.34	Características morfológicas	16
1.35	Características de cultivo	17
1.36	Modo de acción de los lactobacillus	19
1.37	Importancia del uso de <u>lactobacillus acidophilus</u>	36
1.4	Acidificantes vegetales	38
1.41	Administración de acidificantes a las raciones para cerdos	38
1.42	Uso de vinagre y limón	44
1.5	Prueba de ana ligada en conejo	46
2.0	OBJETIVOS	48
3.0	MATERIAL Y METODOS	50
3.1	Origen de las cepas	50
3.2	Cultivo e identificación de las cepas...	50
3.3	Inhibición del crecimiento de <u>E. coli</u> ...	51
3.31	Inhibición del crecimiento de <u>E. coli</u> in vitro, usando acidificantes biológicos	51

3.32	Inhibición del crecimiento de <u>E.coli</u> , in vitro, usando acidificantes vegetales	52
3.4	Inhibición de la actividad enterotóxica en asa ligada de conejo	53
3.5	Estudios histopatológicos	54
4.0	RESULTADOS	59
4.1	Identificación de las cepas	59
4.2	Inhibición del crecimiento de <u>E.coli</u> ...	59
4.21	Acidificantes biológicos	59
4.22	Acidificantes vegetales	60
4.3	Resultados histopatológicos	60
4.31	Acidificantes biológicos	61
4.32	Acidificantes vegetales	61
4.4	Inhibición de la actividad enterotóxica.	62
4.41	Acidificantes biológicos	62
4.42	Acidificantes vegetales	62
4.5	Estudio comparativo in vitro e in vivo de los acidificantes biológicos y vegetales	63
5.0	CUADROS	64
6.0	GRAFICAS	83
7.0	DISCUSION	96
8.0	CONCLUSION	101
9.0	APENDICE	104
10.0	BIBLIOGRAFIA	106



1.0 INTRODUCCION

1.1 Generalidades

Las enfermedades entéricas de los cerdos son un síndrome complejo y comprenden un gran número de agentes causales, oportunistas secundarios y factores desencadenantes. No obstante numerosos datos indican que ciertos serotipos de E. coli (Rutter 1975); se encuentran con frecuencia implicados en los trastornos del tracto intestinal de lechones recién nacidos principalmente.

En México, Berrucos en 1965, reportó un porcentaje de mortalidad anual de 28.37% de un número de 5,159 lechones, antes del destete.

En la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, se estudiaron los registros correspondientes a los años 1973-1974, concluyendo que el 25% de los 4593 lechones nacidos, murieron antes del destete, en donde la mortalidad más elevada fue observada durante los primeros seis días de edad, (Bruchman et al 1976).

En otro estudio realizado en el Estado de Hidalgo, se observó que el 61.5% de las muertes ocurrían durante la primera semana de vida y la colibacilosis entérica, como causa de mortalidad, ocupó el 15.5% (Trujano y Méndez, 1981).

En una granja del Estado de México, Flores 1984, observó que los problemas de diarreas en lechones lactantes, se presentaban primordialmente en las dos primeras semanas de vida del lechón.

Los datos anteriores fueron realizados en granjas aisladas lo que impide tener una estimación verídica

de la mortalidad de lechones a nivel nacional,

Sin embargo, si consideramos que según censos existentes durante los últimos años en la Dirección General de Ganadería, la población reportada de hembras de vientre es de \$2'042,505 las cuales según los censos tienen un promedio de seis lechones al año, que representaría un nacimiento anual de 12'225,000 lechones en todo el país. Se infiere también que de estos lechones nacidos, únicamente un 42.65% (5'227,418) llega a su etapa final de sacrificio en los rastros (Ramírez 1974).

Considerando que aproximadamente sólo un 7.2% a un 8% de las muertes ocurren durante el período de engorde (Jones 1969; Cristian y Baker 1974), no sería de sorprenderse si la mortalidad de lechones a nivel nacional alcanzara cifras hasta de un 50%. Sin embargo, todo esto son simples suposiciones, sobre todo si consideramos que se ignora la cantidad de cordos sacrificados clandestinamente y sólo recalcan la necesidad de futuros estudios estadísticos a nivel nacional, que nos revelen con exactitud la cantidad de lechones que mueren antes del destete; cifras que probablemente representarían una de las primeras pérdidas económicas de la Porcicultura Nacional.

En otros países también se ha visto que el período más crítico en la vida del lechón es la que va del nacimiento al destete.

En Minnesota, Kermkamp 1965; después de estudiar los reportes de cinco granjas, llegó a la conclusión de que aproximadamente una tercera parte de los lechones que nacen vivos mueren antes del destete, observó también que el 32.57% de las muertes ocurrieron durante el primer día, el 20.2% durante el segundo día, el 16.5% durante el

tercero y el 11.8% durante el cuarto día.

En Escocia, Sharman et al 1971; al estudiar la mortalidad de una explotación del tipo "mínimo número de enfermedades" de 174 vientres, observaron que el 27.7% de las muertes que sufrieron los lechones antes del destete, un 20% fue en animales menores de cuatro días de edad.

En Suecia, Bäckström 1973; (citado por Uruchurtu y Ibortto 1975), recopiló los registros de 834 granjas, llegó a la conclusión de que el 75% de las muertes de los lechones ocurrían durante la primera semana de edad.

Por lo anterior se ve que los problemas de mortalidad de los lechones son de mayor interés antes del destete, siendo los problemas gastrointestinales uno de los de mayor relieve.

1.2 Diarrea y mecanismo de acción

Se define a la diarrea como el resultado del incremento en la secreción de agua y electrolitos en el lumen intestinal y que son eliminados por las heces. (Romero y Ambriz 1987)

Respecto a su mecanismo de acción se podría decir que existen cuatro mecanismos fisiológicos para la presentación de la diarrea:

MECANISMO DE ACCION

Hipersécración

Mala absorción

Permeabilidad intestinal incrementada

Aumentos de motilidad

Hipersecreción

Esta alteración resulta de un aumento neto de los líquidos y electrolitos en la luz intestinal y por lo general se presentan pocas alteraciones en la mucosa. Funcionalmente la secreción por la mucosa excede a la capacidad de absorción del intestino.

La colibacilosis es el tipo más frecuente de diarrea secretora en los lechones. (Romero y Ambriz 1987).

Mala absorción

Por lo general la destrucción de las células de absorción de las vellosidades disminuye la capacidad de absorción ocasionando atrofia de las vellosidades. Los agentes etiológicos involucrados en esta alteración son en su mayoría virus, tales como Rotavirus, y Coronavirus. En México se ha detectado un sólo tipo de Rotavirus asociado a la diarrea de los lechones. (Ruiz et al, 1985).

Permeabilidad intestinal incrementada

Las lesiones inflamatorias o necróticas del intestino, pueden causar el movimiento de exudados y fluidos hacia el lumen, reduciendo la capacidad de absorción intestinal, debido al incremento de la presión hidrostática y del tamaño de los microporos, facilitando el paso de fluidos hacia el lumen, así como también Clostridium perfringens tipo C y la Strongiloidosis (Romero y Ambriz 1987).

Aumento de motilidad

En la actualidad no existen datos suficientes de que el aumento de motilidad intestinal sea el factor primario en la presentación de diarrea. En teoría un incremento en la intensidad y frecuencia del movimiento peristáltico no permitiría la permanencia adecuada de contacto entre la mucosa y el contenido intestinal, alterándose la

digestión y la absorción, aunque esto también representaría una ventaja ya que impediría la colonización intestinal por el agente etiológico. Sin embargo, está demostrado que en muchas formas de diarrea, en un principio se presenta hipomotilidad, permitiendo la colonización del agente infeccioso, probablemente por una acción inhibitoria de dichos agentes sobre la función autónoma motora, con la consecuente baja de motilidad intestinal; en este caso, la licuefacción de las heces vendría a ser consecuencia del incremento en el volumen de fluidos o secreción hacia la luz intestinal. (Romero y Ambriz 1987)

1.21 Causas de Diarrea

Al nacimiento, el lechón es extremadamente sensible a las infecciones ya que no posee suficientes medios de defensa antes de la primera ingestión de calostro. (Bohl 1979, Morilla 1983); esto es debido a que la inmunidad transmitida de la cerda al lechón por la placenta es nula por un tipo de placentación que es epiteliocorial siendo seis capas tisulares las que separan la circulación materna de la fetal. (Tizard 1981; citado por Romero y Ambriz 1987).

El lechón recién nacido puede ser presa fácil de infecciones debido a:

- 1) Una insuficiencia fisiológica del control térmico por lo que requiere una fuente de calor.
- 2) A la hipoglicemia presente en el cerdo, durante los primeros días de vida, al bajo contenido de carbohidratos, tales como la lactosa, en el calostro.

El aparato digestivo presenta limitaciones funcionales debido a la deficiente secreción enzimática y acidez; estas se ven influenciadas por numerosos factores tales como: edad, tipo de alimento, contenido gástrico, manejo y medio ambiente.

La edad quizá sea el factor más importante en cuanto a pH gástrico se refiere, ya que los valores del pH del lechón son relativamente ácidos durante las primeras semanas de vida. El lechón recién nacido tiene un pH gástrico del orden de 5.2 a 5.3, cifras que descienden a las pocas horas, hasta valores que oscilan entre 3 a 4, manteniéndose este nivel hasta las 5 ó 6 semanas de vida, edad en que el pH gástrico alcanza niveles inferiores a 2 (Buchal 1984).

Además los riñones inmaduros son incapaces de concentrar la orina en forma eficiente lo que incide en la rapidez y la gravedad de la deshidratación cuando el lechón presenta vómito y diarrea (McDonnal 1978; citado por Romero y Ambriz 1987).

Todos estos factores se van a manifestar en muchas ocasiones con alteraciones en el tubo digestivo, ocasionando diarrea cuyo diagnóstico se complica debido a los factores predisponentes y en las causas multifactoriales que la provocan (Estrada y Enríquez 1983)

La ingestión adecuada de cantidades de anticuerpos colostrales es un factor de extrema importancia para la prevención neonatal en enfermedades entéricas de los animales durante las primeras horas de vida.

Bajos niveles de anticuerpos colostrales en un animal expuestos a malas condiciones higiénicas, puede

permitir la replicación bacteriana o viral, y puede resultar la enfermedad clínica. (McNulty 1980).

1.22 Prevención y control de diarreas

Para prevenir la presentación de diarreas por E.coli patógena, se ha sugerido la administración de Lactobacillus a los lechones recién nacidos, así como la administración de vinagre al 10%, con el fin de fomentar la colonización del tracto intestinal con esta flora láctica beneficiosa. Este efecto se potencializa cuando se le administran los Lactobacillus a la cerda durante la última semana de la gestación; ya que al momento del parto son precisamente estos microorganismos los que la cerda excreta, ayudando a la colonización y a que exista una menor contaminación ambiental por microorganismos patógenos (Morilla 1986).

Es por estas razones que se decidió trabajar con acidificantes biológicos como los Lactobacillus y con acidificantes vegetales como los vinagres, con el fin de llevar a cabo un estudio comparativo entre ellos.

1.3 Acidificantes biológicos

Dentro de los acidificantes biológicos más empleados están los probióticos; es una palabra dada por Parker en 1974, se deriva de dos palabras griegas que significan "Pro-vida" y contrasta con los antibióticos que significan "contra la vida".

Parker's la define como organismos y sustancias, las cuales contribuyen al balance intestinal microbiano, esta definición abarca cultivos microbianos, células microbianas, metabolitos microbianos y preparaciones comerciales antibióticas.

El término probiótico es comúnmente usado para describir suplementos alimenticios para animales, también incluye el yogurt como consumo humano.

La flora nativa permite realizar la función de protección contra enfermedades y digestión de nutrientes, bajo ciertas condiciones. Desafortunadamente hay circunstancias en donde la flora intestinal se agota, y es el momento cuando los suplementos probióticos tienen un máximo efecto.

Los probióticos poseen efectos benéficos porque proveen al organismo de bacterias vivas, las cuales metabolizan in vivo y proveen nutrientes, enzimas o sustancias antibacteriales, antagonistas para bacterias nocivas. (Fuller 1986).

1.31 Tipos de probióticos disponibles

Hay muchos tipos de suplementos alimenticios bacterianos, los cuales son comercialmente aprovechables.

El yogurt (leche fermentada por L. bulgaricus y Streptococcus thermophilus), es el más viejo ejemplo de esta clase de suplementos alimenticios. Aunque originalmente producidos por el consumo humano, el yogurt es dado como alimento a los cerdos.

Los efectos benéficos del yogurt se deben a Metchnikoff's 1907, citado por Fuller 1986; debido a la relación de la longevidad de los campesinos Búlgaros y a su consumo de grandes cantidades de leche fermentada. La leche fermentada desarrolla organismo tales como Lactobacillus acidophilus el cual puede colonizar el tracto gastrointestinal. (Rettger y Cheplin 1921)

Rosales et al 1983; hicieron un estudio en una granja del Estado de Jalisco, donde se presentaba un brote de diarreas en cerdos probablemente debida a E.coli, se comparó el efecto del Yogurt (contenia L.bulgaricus), administrado por 7 días, contra una suspensión de: L.acidophilus, L.acidophilus bifidus, L. bulgaricus y Enterococcus lactis por 10 días a los animales.

Se observó que la diarrea de la primera semana desapareció con la administración del yogurt o la suspensión, este efecto es semejante al que informa Kohler y Bohl 1964, y en el grupo tratado con yogurt apareció una diarrea leve en un gran número de animales cuando se dejó de administrar.

La mortalidad fue del 15% en el grupo testigo, 2.6% en el grupo tratado con yogurt y de 1.3% en el grupo tratado con la suspensión.

La ganancia promedio de peso por animal a los 30 días no fue estadísticamente significativa.

Una probable explicación del incremento de diarreas pudiera ser debido a que L. Bulgaricus no se establece, en cuanto se deja de administrar, hay modificación del pH intestinal y ocurre una rápida multiplicación de bacterias y sus metabolitos o toxinas que pudieran provocar diarrea leve (Rubin y Vaughan, 1979); mientras que la suspensión que contiene L.acidophilus tiene la característica de establecerse en el intestino del lechón, y prevenir de esta manera las diarreas.

El efecto del yogurt puede ser producido por leche acidificada con ácido láctico al mismo pH del yogurt (pH: 4.2). Esto ilustra el punto de que algunas preparaciones probióticas pueden estar ejerciendo su efecto, no por la provisión de organismos vivos, sino por el aporte de metabolitos bacterianos preformados.

Además del yogurt existen preparaciones las cuales son producidas comercialmente como suplementos alimenticios para animales, basados en cultivos de *Lactobacillus*. Dentro de estos se encuentran: Biomax, Lacta-a-bac, Probios y Pronifer.

Otras preparaciones de probióticos (LBC o Feedmate) contienen *Streptococcus faecium*, o como el Toyocerim o Floramate que contiene un *Bacillus* sp. y el Probigest, que se obtiene de las fracciones líquidas de contenidos estomacales de rumen.

Underhal et al 1982, encontró que Feedmate protege a cerdos contra las diarreas por *E.coli*. Pollan et al 1980, comparó los efectos de Probios con los de Feedmate encontrando que los Probios son mejores que Feedmate en cerdos.

Se han empleado a fagos con efectos antibacteriales por muchos años, pero los primeros intentos de uso terapéutico no fueron exitosos. (Wilson y Miles 1964).

Smith y Huggins 1983, sin embargo han reexaminado el uso de fagos como agentes para prevenir diarrea en cerdos y ganado con resultados positivos. En algunos casos fue necesario usar dos cepas de fagos para combatir el

desarrollo de cepas resistentes E. coli. La desventaja es el pequeño margen de actividad del fago.

Los fagos usados atacan específicamente a los antígenos K ó a las estructuras muy cercanamente asociados con ellos.

Sería mejor usar fagos que ataquen a receptores que están más ampliamente distribuidos entre los E. coli enteropatógenos. Se sugiere que para atacar mejor estos puntos no pudiera adherir factores K88 y K987p (Smith y Huggins 1983).

Fuller 1986, trabajó con Streptococcus faecium, el cual deprime el crecimiento de los pollos, demostró que aunque el conteo de Streptococcus faecium, no parece estar afectado cuando el fago estuvo presente, éste se volvió fago resistente, y algunas veces el crecimiento de los pollos fue aumentado, porque el fago resistente al Streptococcus faecium estaba teniendo menos efectos adversos en el crecimiento.

Igualmente Smith y Huggins 1983, encontraron que cuando E. coli patógeno se vuelve fago resistente causa menos diarrea.

Otro grupo de sustancias probióticas son aquellas que consisten de productos metabólicos estériles. Estos suplementos pueden introducir algo nuevo dentro del ambiente del intestino, o ellos pueden aumentar la concentración de algo ya reducido por la flora indígena, pero cuya concentración está limitada por las condiciones existentes in vivo. Un ejemplo es el SRE (Extracto de Rumiante Estabilizador), éste es un contenido de rumen filtrado y seco. Pruebas con ganado vacuno (Zioloche et al 1984),

dan un incremento no significativo en la ganancia de peso diario.

Suplementaciones con SRE tuvieron un efecto benéfico en la salud del ganado vacuno por prevenir la diarrea. Aun cuando la diarrea ocurriera en el grupo SRE será menos severa y menos persistente.

Por último la administración de cepas de E.coli a cerdos, es un acercamiento lógico al diseño de suplementos probióticos.

Barrow y Tucker 1986, mostró que la administración oral de una mezcla de 3 cepas de E.coli a pollos de un día de nacidos, inhibían la colonización en el ciego por Salmonella typhimurium.

E.coli también fue usada por Davidson y Hirsch 1976, para proteger cerdos en contra de la infección de E.coli. Esto se basa en que E. coli patógena necesita adherirse al epitelio del intestino por unos sitios receptores específicos (Jones y Rutter 1972).

Será posible producir resistencia bloqueando estos sitios con una cepa adherente no patógena de E.coli, clasificando a los cerdos con cepa de E. coli K88⁺ Ent⁺ cepa p66 serotipo O8:K40, H8ab:H9, y produjeron protección contra una cepa de E.coli K88⁺ Ent⁺ cepa p66 serotipo O8:K40, H8ab:H9,

1.32 Lactobacillus

De todas las bacterias usadas como probióticos, los lactobacillus revisten especial importancia, han sido las elegidas para ser administradas a cerdos recién nacidos, ya que algunas contribuyen a formar parte de la flora microbiana del tracto intestinal, (Morilla 1986).

Los lactobacilos son catalasa negativos y no forman esporas. La tolerancia de acidez de estas bacterias, que son denominadas ácido lácticas es muy útil para el aislamiento de cultivos, como para la diferenciación del grupo (Holt 1979).

1.33 Clasificación

Familia: Lactobacillaceae

Género: Lactobacillus

Los Lactobacillus, según los productos de fermentación de azúcar, se divide en:

I HOMOFERMENTATIVAS

II HETEROFERMENTATIVAS

I HOMOFERMENTATIVAS

El ácido láctico es el mayor producto de la glucosa (generalmente 85% ó más).

A. No hay gas de glucosa o gluconato; no fermentan ribosa, la tiamina no es requerida, actividad de aldosa, produce ácido láctico D ó L, ó DL, G+C=34.7---50.8%, generalmente crecidas a 45°C ó más, generalmente no crecen a 20°C, ni a 15°C. Las colonias normalmente se convierten de ásperas a suaves, y compactas en la

presencia de tween 80 u otro oleato de sodio. (Holt 1979).

1. Produce ácido láctico D (-).

1. L. delbrueckii
2. L. leichmannii
3. L. jenssenii
4. L. lactis
5. L. bulgaricus

2. Producen ácido láctico DL.

6. L. helveticus
7. L. acidophilus

3. Producen principalmente ácido láctico L (+) y muy pocas cantidades de ácido láctico D (-).

8. L. salivarius

B. No gas de glucosa, gas de gluconato. La ribosa, cuando se fermenta, produce ácido acético y láctico sin gas. No requieren tiamina. Actividad de aldosa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa reduce la actividad de 6 fosfogluconato deshidrogenasa. Crecimiento variable a 45°C. Crecimiento a 15°C. G+C=45 --- 46.4%

1. Producen principalmente ácido láctico L (+). Fermentan ribosa.

- 9a-9c. L. casei subespecies casei, rhamnosus, qqalactosus
- 9d. L. casei subespecies tolerans.
10. L. xylosus

2. Producen ácido láctico DL. Fermentan ribosa.
 - 9a. L. casei subespecies pseudopiantarum.
 11. L. plantarum
 12. L. curvatus
3. Produce ácido láctico DL. Fermentación de ribosa equívoca.
 - 13a. L. coryniformis subespecies coryniformis
4. Produce ácido láctico D (-). No fermentan ribosa. Favorable a pH cerca de 5.
 - 13b. L. coryniformis subespecies torquens.
 14. L. homohiochii.

II. HETEROFERMENTATIVAS

Producen cerca de 50% de productos finales de glucosa como ácido láctico, considerables cantidades de CO_2 , ácido acético, etanol, manitol de fructosa y glicerol.

- A. Gas de glucosa y gluconato. Fermentan ribosa para ácido acético y láctico sin gas. Requieren tiamina, producen ácido láctico DL, la aldosa no es demostrable. La actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa son demostrables.
 1. Crecimiento a 45°C, no crece a 15°C
 15. L. fermentum
 2. Crecimiento variable a 45°C y 15°C, no crece a 48°C
 16. L. cellobiosus

3. Generalmente crecen a 15°C, no crecen a 45°C

17. L. brevis

18. L. buchneri

19. L. viridescens

III. HETEROFERMENTATIVAS

Producen ácido láctico DL, CO₂ y acetato.

Dentro de este grupo, se encuentran los organismos menos conocidos. Creciendo indiferente hacia la mayoría de los carbohidratos. No son estudiadas generalmente su nutrición, enzimología, G + C, química de la pared celular y fermentaciones de gluconato y ribosa. (Holt 1979).

Fermentan malonato, fructuosa, gluconato, ribosa y xilosa, variable o baja fermentación de glucosa, galactosa, sucrosa y maltosa, tolerancia al etanol de 15-18%, pH inicial óptimo de 4.5 - 5.5 y temperatura óptima menor de 30°C y buen crecimiento a 10°C.

24. L. desidiosus

El ácido hiochic (ácido D-mevalónico) es esencial para el crecimiento. Favorable a pH cerca de 5.

25. L. heterohiochii (Holt 1979).

1.34 Características morfológicas

Son microorganismos Gram positivos, pero a medida que transcurre el tiempo se vuelven más ácidos y se convierten en Gram negativos.

Son bastones delgados y largos; curvos o rectos; siros son parecidos al cocobacilo; usualmente se encuentran

solos o formando cadenas; está se da particularmente en la última fase logarítmica del crecimiento. Stamer 1979; observó diferente morfología de L. brevis cuando creció en suero de tomate y en medio basal conteniendo suero de tomate por 36 horas a pH 4.4 encontrándose que la morfología varía, ya que en el primer medio el tamaño de la bacteria va de 0.5 micras x 2.9-57 micras, en forma cocobacilar.

Los lactobacillus son inamóviles, algunas cepas son móviles, como L. plantarum, L. curvatus y L. ruminis (Stamer 1979).

Muchos cultivos muestran una forma diplobacilar característica, frecuentemente los cultivos viejos muestran considerables pleomorfismo.

Algunas cepas exhiben cuerpos bipolares, granuleaciones internas, teñidas con azul con metileno dan apariencia de bandas. (Holt 1979)

1.35 Características de cultivo

Los lactobacillus se aislan de heces de animales, productos lácteos, vegetales, boca, vagina y tractos intestinales de varios animales de sangre caliente, incluyendo al hombre (Sharpe 1981).

Para su aislamiento primario, los lactobacillus fecales requieren de atmósfera reducida de oxígeno o condiciones anaeróbicas, pero después del cultivo continuo algunas cepas pueden desarrollarse en presencia de aire. El crecimiento superficial en medios sólidos a menudo es aumentado por anaerobiosis con 5-10% de CO₂. (Guilliland et al 1978).

Sus necesidades nutritivas son complejas y la mayor parte de las cepas no pueden cultivarse en los medios nutritivos ordinarios, a menos que se enriquezcan con alguna cosa.

Tramer 1966; uso del caldo TDB (Caldo dextrosa tomate), para el aislamiento de L. acidophilus.

Collins 1979; estudió la capacidad del crecimiento de los lactobacilos, usando diferentes tipos de medios: TJ (Jugo de tomate), EA (Eliker agar), SMA (Standard methods agar), y MRS (Mann Rogosa Sharpe), el cual es usado como medio selectivo para la enumeración de lactobacillus (Rogosa, Mitchell y Wineman 1951; De Man, Rogosa y Sharpe 1960), este medio fue en el que crecieron mejor las colonias de lactobacilos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

Sally 1985; observó que especies de levaduras son capaces de crecer en este medio, aún en presencia de ciclohexamidas; este crecimiento es debido a que al igual que las bacterias ácido-láctico, las levaduras son capaces de crecer a pH bajo.

Las necesidades individuales de aminoácidos varían de 2 a 15; en general se requiere piridoxina, tiamina, riboflavina, biotina, ácido fólico y ácido nicotico, variando las necesidades en cada caso.

Baurnefeind et al 1942; citado por Kodicek y Weidon 1945; reportaron que ciertos ácidos grasos que se encuentran en cantidades pequeñas en la leche, estimularon el crecimiento de L. Helveticus en la presencia de cantidades subóptimas de riboflavina.

El ácido linolenico y pequeñas cantidades de ácido oléico, ejercen un efecto inhibitorio en el crecimiento y producción de L. helveticus y otras bacterias Gram positivas. Esto depende de la concentración de bacterias, de el tiempo de incubación, de la cantidades, la naturaleza de los ácidos grados añadidos, y la presencia de lípidos en el medio. (Kodicek y Worden, 1945). Sin embargo el ácido oleico es esencial para algunas bacterias ácido láctico en un medio en el cual incluye biotina. L. arabinosus, requiere ácidos grados insaturados para su crecimiento en un medio el cual carece de biotina, lo cual estimuló la producción de ácido. (Bissinen et al 1950).

1.36 Modo de acción de los lactobacilos

Los modos de acción propuestos para los lactobacilos son:

- I. Disminución del pH intestinal (Mäyra-Mäkinen et al 1983)
- II. Supresión de poblaciones de E.coli intestinal. (Mitchell y Kenworthy 1976)
- III. Producción de una sustancia parecida a los antibióticos, llamadas bacteriocinas. (Gratia 1925).
- IV. Capacidad de adhesión de los lactobacilos.

I. Disminución del pH intestinal.- La reducción de ácido láctico, ácido acético y ácido fórmico por los lactobacilos da como resultado una baja en el pH intestinal, provocando con ello que bacterias patógenas como E. coli,

no colonicen el tracto intestinal y de esta manera prevenir las diarreas, ya que la producción de ácidos es invariablemente acompañada por incremento en las concentraciones de pH. La tolerancia a condiciones ácidas, empieza a ser un valor importante para la sobrevivencia de las bacterias ácido-láctico, como es el caso de los lactobacillus.

Las cepas de lactobacillus de origen porcino, tienen la capacidad de adherirse a las células epiteliales columnar del cerdo, pueden tolerar pH bajo y ácidos biliares, en el estómago y en el intestino. (Mäyra-Mäkinen et al 1983).

Cole et al 1968: administraron en el agua de beber de los cerdos recién destetados, durante cuatro semanas usando diferentes sustancias como: ácido propiónico, propionato de calcio, acrilato de calcio, pero sus efectos no fueron tan marcados como los del ácido láctico. (Kershaw et al 1966, citado por Cole et al 1968).

Se demostró que los efectos de los cuatro tratamientos, fueron observados sólo durante el período de administración del agua de beber. También se realizaron estudios bacteriológicos del cerdo control, en estos se demostró que en duodeno y yeyuno hubo presencia de E. coli hemolítica y no hemolítica, mientras que en los cerdos tratados sólo hubo E. coli no hemolítica.

Los resultados obtenidos con el ácido láctico, no sólo bajan el pH intestinal, sino que es eficiente en ganancia de peso, y en el control de E. coli en el intestino, esto concuerda con lo encontrado por Burnett y Kershaw et al 1976, citados por Cole et al 1968.

Otros investigadores encontraron resultados similares, introduciendo L. acidophilus en la dieta de los cerdos. (Redmond y Moore 1963, citado por Cole et al 1968).

El modo de acción del ácido láctico no es claro, pero en el intestino es producido por Lactobacillus sp, y Leitgeb, citado por Cole et al 1968, demostró una correlación negativa ($r = -0.626$) entre el conteo de lactobacilos (principalmente L. bifidus) y el conteo de E. coli en cerdos. El alimentar a cerdos con ácido láctico puede resultar un medio ambiente adecuado para la existencia y multiplicación rápida de los lactobacilos.

Según Braude et al 1976, citado por Puchal 1984, los valores del pH intestinal son más estables que los del estómago y parte alta del duodeno, por lo que conviene asegurar que la digestión gástrica sea máxima. Por tal motivo es importante lograr una buena acidificación a nivel gástrico no sólo para optimizar la acción proteolítica inicial de la pepsina, sino también para que el bolo gástrico convenientemente acidificado estimule adecuadamente la secreción duodenal, a fin de que el proceso digestivo siga con normalidad.

La sensibilidad de Lactobacillus adhesivos a los ácidos biliares fue probada en agar MRS conteniendo 0.5 y 0.9% de Bactooxygall (Difco) probada en agar MRS bilis como control. (Klaenhammer y Kleeman 1981).

La tolerancia a ácidos biliares varía entre cepas adhesivas de las cuales 9 de 22 cepas toleraron concentraciones de ácidos biliares intestinales. Esta es una buena razón para concluir que estas cepas adhesivas, capaces de bajar el pH, toleran ácidos biliares, son capaces de adaptarse a condiciones en el intestino.

II. Supresión de poblaciones de E. coli intestinal. Las infecciones por E. coli son la principal causa de pérdida en los lechones. En estudios tempranos se ha observado evidencias de la existencia del antagonismo in vivo entre los lactobacilos intestinales y ciertas bacterias entéricas responsables de las infecciones postirradiación en ratas y ratones. (Vincent et al 1955; Haley et al 1957).

Bruce et al 1979; reportaron que la alimentación con L. acidophilus de origen humano o del intestino de vacas, incrementaron el número de lactobacilos en las heces de vacas y redujeron el número de coliformes en heces.

La diarrea neonatal en ciertos cerdos puede ser producida por la ingestión de E. coli con la capacidad de producir enterotóxicas (Smith y Jones 1963; Moon et al 1966; Smith y Ballis 1967; y Gyles y Barnum 1967).

Chopra et al 1963; observaron un incremento en coliformes y reducción de lactobacilos en cerdos con diarrea.

Dubos et al 1965; nota que los lactobacilos fueron predominantes en el tracto intestinal de ratones mantenidos bajo condiciones de limpieza. Este balance entre lactobacilos y coliformes es algunas veces alterado, debido a factores de stress y E. coli enteropatógena (E.E.C.) puede incrementarse y causar colibacilosis bajo estas condiciones.

Mitchell y Kenworthy 1976; estudiaron la neutralización de E. coli dada por los metabolitos de dos bacterias ácido-láctico (L. bulgaricus y Streptococcus faecium), estas tuvieron actividad anti-E. coli usando los sobrenadantes de L. bulgaricus y cultivo total de S. faecium. Respec-

to a la actividad antienterotóxica de L. bulgaricus fue muy débil a las 24 horas y máxima después de 72 horas.

Muralidhara et al 1977; estudiaron la flora bacteriana de heces de los lechones sanos, encontrando que a las 4 primeras horas hubo presencia de lactobacilos y 4 horas después hubo coliformes.

A las 24 horas, los dos tipos de bacterias estuvieron presentes en casi la misma proporción.

Muralidhara et al 1977; encontraron que la flora bacteriana normal de cerdos sanos sin diarrea, es caracterizada en su mayoría por gran cantidad de cuenta de lactobacillus, que la cuenta de coliformes; no así con los cerdos con diarrea, donde se nota lo contrario.

III. Producción de bacteriocinas.

Las bacteriocinas son parecidas a los antibióticos que tienen acción antibacteriana.

Los estudios de bacteriocinas son presentados desde 1925, cuando Gratia observó inhibición de E. coli por E. coli V.

Las bacteriocinas definidas por Reeves, son producidas por especies homo y heterofermentativas del género lactobacillus. Parecen ser una clase natural de antibióticos distinguidos de otros por las propiedades que producen (Jacob et al 1953).

Las bacteriocinas son producidas por varias especies de bacterias, en contraste con otros antibióticos,

actúan únicamente en cepas de células hijas o especies íntimamente relacionadas; también ellas son proteínas específicas, asociadas con lipopolisacáridos en el caso de algunas bacterias Gram negativas.

Las bacteriocinas son de peso molecular bajo, y probablemente análogos de algunos metabolitos, actuando competitivamente por ocupar los sitios activos de las enzimas.

De Klark y Coetzee (1961) encontraron que la dilución máxima en la cual los sobrenadantes de cultivos de lactobacilos son activos fue 1:10, variando el pH entre 3,6 y 4,1 sin afectar la actividad por el ajuste a pH=7 y/o por las pautas de agar enterrado a pH=7.

Las bacteriocinas son detectadas en los sobrenadantes de 10 días en el caldo viejo. La actividad inhibitoria de sobrenadante puede ser concentrada por precipitación con sulfato de amonio, permitiendo que halla difusión de más de 1 centímetro de el pozo central en el agar, (De Klark 1967a).

El mecanismo de acción letal de las bacteriocinas, se inicia con la adsorción, penetración y muerte de las células sensitivas. Este procedimiento es irreversible y no se propaga, por lo cual resultan unos niveles finitos de células muertas proporcionales a la concentración de la bacteriocina, (Tagg et al 1976).

Las bacteriocinas de Bacteroides uniformis T1-1 presentes en el medio de cultivo, han reportado una unión a componentes celulares tales como vesículas membranosas, - esto confiere un PM grande aparentemente a los agentes anti microbiales. Sin embargo, dicha actividad de las bacteriocin

na puede ser disociada de estas vesículas membranosas por tratamientos con hidrócloride guanidina o urea en el medio de cultivo, (Austin-Prather y Booth 1984).

Hasta el momento han sido estudiadas bacteriocinas de algunas especies de Lactobacillus como son las del:

Lactobacillus acidophilus
Lactobacillus fermentum
Lactobacillus helveticus
Lactobacillus bulgaricus

Bacteriocina de L. Acidophilus

Sabino (1964) citado por Ramer (1966) demostró el efecto como antibiótico de L. acidophilus por crecimiento en un medio sólido con pozos, nombrado Staphylococcus y Escheria como organismo prueba.

Afirmó que la inhibición observada no fue un resultado de acidez, ya que no hubo diferencia en el pH de el agar, de la zona de inhibición o en la zona exterior. La sustancia antibiótica se dice ser extremadamente lábil.

Vicari et al (1959) trabajaron con cepas de L. acidophilus aisladas de ratones, ratas, conejos, hamster y humanos, con el fin de encontrar un agente antimicrobiano. La sustancia responsable ha sido llamada "Lactocidin".

La "Lactocidin" cruda tuvo un espectro antimicrobial amplio, y fue activa en presencia de suero. La "Lactocidin" purificada fue inestable y fue inactiva en suero.

Se mostró la actividad inhibitoria contra numerosos géneros, incluyendo Proteus, Salmonella, Escherichia, Staphylococcus, Bacillus, Streptococcus y Lactobacillus.

A causa de la actividad de amplio espectro de lactocidina (Vincent et al 1959), concluyeron que L. acidophilus ocupa una importante posición en el control de la microflora no deseable en el tracto intestinal de animales y humanos.

Barefoot y Klaenhammer 1983; de un total de 52 cepas de L. acidophilus, el 63% demostró actividad inhibitoria contra L. leichmanii 4797, L. bulgaricus 1489, L. helveticus 87 y L. lactis 970.

Cuatro cepas de L. acidophilus con esta actividad, también inhibió a Streptococcus faecalis y L. fermentum, sugiriendo un segundo sistema de antagonismo.

Estudios de ultrafiltración indican un peso molecular de aproximadamente 100,000 para el inhibidor crudo y para el purificado un peso molecular de 6,000. El agente fue sensible a las enzimas proteolíticas como pronasa y proteínasa, y retuvo completa actividad después de 60 minutos a 100°C (pH = 5).

La actividad en contra de las células sensibles fue bacteriocida a los 30 minutos de exposición con lactacin B, pero no bacteriolítica. Estas características identificaron al agente inhibitorio como una bacteriocina, designada Lactacin B.

La actividad producida por lactacin B fue eliminada por tratamiento con 500 ug de proteasa/ml por una

hora a 37°C. Las reducciones poblacionales fueron proporcionales a la concentración de Lactacin B presentes. Es estable al calor una hora a 100°C, pierde su actividad bajo condiciones tamponadas empleadas.

Bacteriocinas de L. fermentum

Cepa 466.

Las bacteriocinas producidas por L. fermentum, fueron estudiadas por De Klerk 1967a, las cuales estuvieron presentes a bajos títulos en cultivos de sobrenadante de toda la noche, y no fueron inducibles por la radiación ultravioleta. Son estables al calor a 30 minutos a 96°C y sensibles a tripsina o pepsina pero no a lisozima. Estudios de electroforesis no hubo migración. Al microscopio electrónico no demostraron la presencia de ningún fago. Es una proteína macrocelular lipocarbohidrica, consiste de 16 aminoácidos, 4 azúcares, hexosamina y fósforo. La actividad biológica de este compuesto es dependiente de su integridad estructural (De Klerk 1967a). La composición química de las bacteriocinas de L. fermentum cepa 466 son:

Nitrógeno	4.96%
Proteínas	25.80%
Lípidos	20.80%
Carbohidratos	53.20%
Hexosamina	0.80%
Fósforo	0.30%

La composición de carbohidratos:

Galactosa	19.4%
Glucosa	16.7%
Manosa	16.7%
Ramnosa	7.2%

La pared celular de L. fermentum contiene: galactosa, glucosa, glucosamina, aspartato, glutamato, alanina y lisina (Ikawa y Shell 1960).

Bacteriocina de L. helveticus
Cepa LP27.

Upreti y Bindhill 1975, observaron que esta cepa produce una bacteriocina, llamada "Lactacin 27", la cual fue aislada de un cultivo de sobrenadante, fue un complejo no dializable, el Lactobacillus purificado tuvo un PM de 12.400 (Upreti y Bindhill 1973), compuestos de carbohidratos y proteínas; este complejo puede ser disociado por SDS (sodio, dodecil, sulfato), en cantidades de PM bajo. Es estable al calor 1 hora a 100°C, se inactiva con pronasa y tripsina.

La producción de Lactacin 27 no es controlada por un plásmido extracromosomal.

Lactacin 27 tuvo un efecto bacteriostático en una cepa indicadora de L. helveticus cepa L516, inhibió primero síntesis de proteínas sin afectar al DNA, RNA y a la síntesis de ATP-5. También inhibió a L. acidophilus y unos aislados naturales de especie de Lactobacillus.

No hubo actividad de absorbancia a la luz ultravioleta, pero causó la salida de iones potasio y un flujo inicial de iones intracelulares. La pérdida de iones potasio debida a tratamientos con Lactacin 27 sugiere que esta actúa en la membrana celular.

El almacenamiento prolongado de la cepa L. helveticus LP27 por aprox. un año, perdió el 50% de su habilidad para producir Lactacin 27.

La adsorción de Lactacin 27 pudo únicamente ser demostrada a un máximo de 2 U.I. de concentración. Sin embargo, Lactacin 27 absorbió a varios microorganismos sin hacer caso de la susceptibilidad, esta adsorción no específica puede ser debida a la presencia de lípidos y carbohidratos.

Cepa 481.

Joerger y Klauenhammer 1986; estudiaron las propiedades de otra bacteriocina producida por L. helveticus cepa 481 que fue llamada "Helveticin J".

Fue activo contra 5 especies íntimamente relacionadas, como son:

L. helveticus 1846 y 1244; L. bulgaricus 1373 y 1489; y L. lactis 970. El compuesto antimicrobial fue activo a pH neutro bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, fue sensitiva a las enzimas proteolíticas tales como ficina, pronasa, tripsina, pepsina, proteinasa K, y subtilisina después de un período de incubación de una hora a 37°C, y fue sensible al calor por 30 minutos a 100°C.

Experimentos de ultrafiltración de cultivos de sobrenadante conteniendo a la bacteriocina, revelaron que "Helveticin J" estuvo presente como un agregado con un peso molecular en exceso de 300,000.

En estudios electroforéticos Helveticin J purificado tuvo una banda de proteínas de 37,000 daltons. Se encontró un plásmido designado PMJ1008.

Bacteriocinas de L. bulgaricus

Cepa DDB14

Reddy y Shahani 1971; encontraron que varias cepas de L. bulgaricus produjeron una actividad antibiótica, en leche espumosa a 45°C por 48 horas. La actividad antibiótica no fue debida a H₂O₂ ó al ácido láctico. La sustancia antibiótica purificada fue llamada "Bulgarican", la cual fue afectada grandemente por el pH, es activa a pH ácido e inactiva a pH neutral y alcalino, es altamente termolabile y su actividad no fue destruida a 21°C después de 9 días.

Esta bacteriocina es activa contra varios géneros Gram positivos y Gram negativos como: Bacillus, Streptococcus, Staphylococcus, Sarcina, Pseudomona, Escherichia y Serratia.

IV. Adhesión de los Lactobacilos.- La asociación íntima de la flora de lactobacillus en el intestino, con las superficies epiteliales intestinales, fueron primero demostradas por Dubos et al 1965, y más tarde por Fuller 1978, se demostró que la adhesión estuvo relacionada a el potencial de colonización. El establecimiento y mantenimiento de poblaciones microbianas en el tracto digestivo, la adhesión entre los organismos y las paredes del tejido son necesarias. Esta asociación es comunmente llamada colonización o implantación.

Los microorganismos que proliferan en una capa de mucina pueden hacer uso de esta como una fuente energética. Las ratas con gérmenes libres excretan más constituyentes mucosos que las ratas convencionales. Los microorganismos intestinales degradan constituyentes de la mucosa, particularmente la mitad de los carbohidratos (Hoskins y Zamcheck 1968).

Takeuchi y Savage 1973: reportaron que únicamente ciertos lactobacilos pueden unirse al epitelio escamoso gástrico en la mucosa. Esta especificidad es debida a la presencia de una sustancia particular "ácido mudeopolisacárido" producida por la bacteria.

Suegara et al 1975: investigaron el comportamiento de la microflora en el estómago de ratas. Para ello aislaron bacterias indígenas de humanos, cerdos, ratas, y pollos en donde estas dos ultimas se adherieron a células queratinizadas obtenidas de los estómagos hospederos de ratas mantenidas in vitro.

Únicamente L. fermentum, L. acidophilus y Staphilococcus epidermis NI, aislados en ratas, atacaron a células epiteliales queratinizadas de el estómago de ratas, esto sugiere que estas bacterias son dominantes en la microflora de el estómago.

Los lactobacilos indígenas tratados a 60°C por una hora o tratados con detergentes: SDS, Tween 80 y Triton X-100 ocasionó pérdida en la habilidad a adherirse a las células queratinizadas. Sin embargo los lactobacilos tratados con formalina, retuvieron la capacidad de adherirse a dichas células. Estas observaciones sugieren que las estructuras superficiales de la bacteria están involucradas en la adhesión de los lactobacilos indígenas a las células queratinizadas del estómago de la rata in vivo.

La adhesión in vivo de Staphilococcus en el estómago se efectúa cuando las ratas están libres de lactobacilos, pero no son observados después de que se han inoculado primeramente con lactobacillus. (Morotomi et al 1975)

Numerosos estudios en sistemas de animales demuestran que los lactobacilos colonizan superficies intestinales por adsorción a las células epiteliales gástricas. (Fuller 1973; Kotarsk y Savage 1979; Savage 1978). Esta asociación con superficies epiteliales es un determinante importante durante la colonización de el tracto gastrointestinal. (Savage 1975, Savage 1978). La morfología colonial, pases en caldo serrados, congelación y liofilización, no afectan la adherencia de L. acidophilus (Kleeman y Kleenhammer 1982).

No hubo cambios en la adhesión de lactobacilos porcinos después de seis meses de almacenamiento en agar MRS y en su estado liofilizado (Mäyra-Mäkinen et al 1983).

Fuller y Bocker 1980; citados por Nedström et al 1987; demostraron que los lactobacilos poseen fimbrias vellosas superficiales y microcapsulares llamadas glicocalix superficial bacterial, localizada en la superficie mucosal. Estas fueron propuestas para determinar la colonización de las criptas epiteliales en pollitos, así como la interacción con el epitelio escamoso de la parte esofagica de los cerditos.

Kleeman y Kleenhammer 1982; estudiaron la adherencia de especies de Lactobacillus a las células intestinales fetales humanas, por un sistema in vivo, dos mecanismos de adherencia fueron encontrados: un mecanismo requirió calcio en la reacción de adherencia, fue no específico y permitió que los lactobacilos probados se adherieran, el otro sistema, no requirió calcio, y fue encontrado en cuatro cepas de Lactobacillus acidophilus de origen humano.

El calcio puede actuar proporcionando un puente iónico entre cargas negativas superficiales de células bacteriales y epiteliales. (Booker y Fuller 1975; Costerton et al 1978).

Los cationes di y trivalentes juegan un papel muy importante en muchos sistemas de adherencia (Carruthers y Anderson 1979; Plotkin y Bemis 1980, Speck 1980). Sin embargo los efectos de estos cationes parecen ser una función de fuerzas físicas o enlaces químicos y no un mecanismo de adherencia específico (Curtis 1962).

Kleeman y Kleenhammer 1982, encontraron que la habilidad de los lactobacilos para adherirse a las células epiteliales intestinales in vitro varía considerablemente entre cepas.

Mäyra-Mäkinen et al 1983; estudiaron in vitro la adherencia de los lactobacillus y streptococcus a las células epiteliales columnares del intestino delgado de cerdos y ganado.

Las cepas porcinas aisladas más frecuentes fueron: L. delbrueckii, L. acidophilus y L. fermentum; 13 de los 22 lactobacilos fueron adhesivos. Todos los streptococcus aislados pertenecen al grupo B de la clasificación de Lancerfield, ninguna de éstas se adherieron a las células epiteliales del cerdo. Las cepas adhesivas 9 de 22 del ganado fueron identificadas como L. fermentum. Se observó que con las mismas especies los grados de adherencia variaron grandemente entre cepas y esto es controlado por plásmidos. Estos resultados difieren con los de Barrow et al 1980, quienes reportaron adhesión únicamente a las células epiteliales escamosas de la boca, esófago y estómago de cerdos.. En contraste a este conjunto de datos, Mäyra-Mäkinen et al 1983, encontraron que los aislados de los lactobacillus

de vegetales, cultivos lácteos y de queso, no se adherían a las células epiteliales columnares de cerdos y ganado *in vitro*.

Cole y Miller (1984) aislaron *L. reuteri*, *L. acidophilus* y *L. salivarius* de estómago, intestino delgado superior, intestino delgado inferior y del ciego de rata *in vitro*. Sin embargo en la prueba de adhesión a los bordes de cepillo duodenal de rata, solamente *L. acidophilus* cepa L-8 aislada de ciego y *L. salivarius* L-5 aislada de intestino delgado inferior, mostraron adhesión.

Se eligió a *L. salivarius* para hacer pruebas en ratos neonatales, dorificando a *L. salivarius* crecido en leche. A los 2 días de administrar el tratamiento, la cuenta de coliformes fue reducida en la región del estómago, intestino delgado y ciego, a los 10 días de tratamiento hubo también un decremento de coliformes, aunque no tan marcado como a los 5 días; esto se debe a cambios en la microflora indígena adquirida naturalmente, y al establecimiento de una cepa lo cuál compite con *L. salivarius* por lo tanto elimina a la cepa *L. salivarius* L-5. Wadström et al (1987) aislaron lactobacilos del intestino delgado de cerdos recién nacidos, para estudiar las propiedades superficiales de estos lactobacilos, las cepas mostraron alta hidrofobicidad superficial, el calor y el tratamiento con proteasas de bacterias de alta hidrofobicidad superficial, incluyendo cepas de autoagregación en solución salina bufferada de fosfatos, mostraron un decline drástico en sus propiedades superficiales. 3 cepas hidrofílicas (LBp 1044, 1068 y 1073) también demostraron unión a las células intestinales pero a nivel más bajo, aproximadamente 5 bacterias por células, como comparación con la mejor unión de cepas hidrofóbicas (LBp 103 aprox. 11 bacterias por célula).

Estos encuentros sugieren que diferencias o mecanismos de adhesión múltiple pueden ser involucradas en la colonización de la mucosa del intestino delgado de cerdos. Se cree que estos dos mecanismos pueden ser más complejos por ciertos patógenos, donde las proteínas superficiales tales como antígenos fimbriales K88, K99 y/o F41 (adhesinas), determinan la unión a células epiteliales e interacción con componentes glico-conjugados específicos en la mucosa.

Los cultivos de cepas referenciadas por Waström et al 1987, crecieron en medio líquido rico en carbohidratos, el cual no afectó el carácter de la superficie celular hidrofóbica. Por lo tanto parece menos probable que los polímeros capsulares de carbohidratos sean los mejores determinantes de la colonización intestinal de lactobacilos de cerdos.

En descubrimientos de contenidos altos de lípidos en la mucosa del intestino de ratas (Slomiany y Slomiany 1984), sugieren que las interacciones hidrofóbicas pueden ser necesarias para colonizar la capa de la mucosa.

Waström et al 1987; demostraron que ninguna cepa del intestino del cerdo formó cápsula; mientras que sólo una cepa de referencia cepa L. casei NCTC 10302 produce un material capsular detectable. Por otro lado se han hecho estudios previos demostrando que la flora de bacterias indígenas aisladas de cervix, vagina y superficies uretrales de mujeres sanas son capaces de adherirse a las células uroepiteliales in vitro, más adelante se reportó que estas bacterias bloquean la adherencia de bacterias uropatógenicas a las células uroepiteliales de mujeres con y sin historia de infecciones del tracto urinario. (Chap et al 1984).

1.37 Importancia del uso de *Lactobacillus acidophilus*

El uso terapéutico de lactobacilos como una ayuda para la cura de una variedad de desórdenes gastrointestinales, son avocados en medicina humana por muchos años.

Gordon et al 1957, demostraron que la adherencia de una cepa de *L. acidophilus* resiste a varios antibióticos, como una ayuda a la terapia antibiótica oral que reprime el desarrollo de *Staphylococcus* (Vincent et al 1955).

Hawley et al 1959 (citadas por King 1968) indicaron que los resultados favorables de la terapia con lactobacilos dependían del uso de una cepa intestinal y de la administración de un gran número de células viables. Es por ello la importancia de que los lactobacilos deben ser incorporados a los productos alimenticios para cerdos.

Se han reportados efectos benéficos de el uso de *L. acidophilus* como un suplemento dietético en alimentos para aves. (Tortuero 1973; Puller 1977; Francis et al 1978).

Dubos y Shzedter 1963 (citado por King 1968); encontró que los lactobacilos son organismos predominantes en las poblaciones microbiales locales de cerdos.

Los lactobacilos parecen ser esenciales para la vida (Shaffer et al 1965, citado por King 1968), reportaron que la ausencia de lactobacilos en el cerdo pueden causar una hipoglucemia fatal.

L. acidophilus. Son usados para frenar las epidemias de enteritis en lechones. Redmond y Moore 1965;

dieron a lechones recién nacidos durante dos meses un cultivo de leche con L. acidophilus y observaron que la incidencia de enteritis se redujo, y el L. acidophilus fue predominante en la flora intestinal de lechones, 18 meses después del tratamiento.

Olson 1961; administró una preparación con L. acidophilus por 10 días a cerdos destetados, los cuales tenían enteritis, encontrando que ésta desapareció y el peso de cerdos se incrementó del 25% al 40%.

King 1968; hizo observaciones en 100 cerdos en engorda con un peso medio de 50-60 kg, mostró que el empleo de 2 g. de un preparado comercial de L. acidophilus, durante 5 días al empezar el período de alimentación, aumentaban notablemente la velocidad media de engorde y el rendimiento medio de la conversión de alimento.

Más adelante King 1968; hizo experimentos con 108 cerdos mantenidos en un peso de 80-100 kg in vivo mostrando que hasta los 45 kg de peso in vivo con el empleo de cantidades similares del preparado de Lactobacillus también aumentaban notablemente la velocidad de engorde y la conversión de alimento. El administrar 4 g. diarios del preparado durante 5 días al principio y dar un segundo curso de 2 g. diarios durante 5 días al llegar a un peso in vivo de unos 45 kg produjo resultados similares. Se cultivaron muestras tomadas en recto y contenidos del tubo digestivo de algunos cerdos, recobrándose en casi todos los casos la variedad específica de L. acidophilus.

Muralidhara et al 1972 y 1973; trabajaron cerdos con problemas de diarrea; formándose dos grupos: a) animales diarreicos y b) animales diarreicos alimentados con concentrados de Lactobacillus, y examinaron microscópicamente al intestino delgado, el cual fue dividido en 9 par-

tes. En los cerdos con diarrea se encontró que E.coli fue distribuida a través de los pilis y en las células epiteliales superficiales. Sin embargo en los cerdos diarreicos alimentados con lactobacilos, hubo gran número de bacilos Gram positivos que estaban unidos a la superficie epitelial y distribuidos a través del pili de la primera parte del intestino delgado, además de que no hubo presencia de E. coli en las primeras 3 partes del intestino delgado, encontrándose colonización por lactobacilos.

Gilliland et al 1980; comparó dos cepas de L. acidophilus, como aditamentos dietéticos en becerros, encontrando que la cepa C-28 (aislada de ileon o del intestino del becerro), fue la más efectiva en el establecimiento de el tracto intestinal de los becerros mientras que la cepa MCFM (aislados del tracto intestinal humano), no tuvo esta misma actividad.

1.4 Acidificantes vegetales

1.41 Administración de acidificantes a las raciones para cerdos.

La utilización de acidificantes en las raciones para cerdos se acentúa cada vez más en algunos países Europeos.

El empleo de su uso es bien simple: el estómago del lechón destetado a edad temprana no secreta la cantidad suficiente de ácido clorhídrico como para que permita la eficaz actuación de la pepsina gástrica, y con ello una máxima utilización de las proteínas dietéticas de tipo vegetal, o mejor dicho, de tipo no lácteo. Esta insuficiencia gástrica natural y propia de la edad, se ve agravada

por la precocidad del proceso productivo del animal, y por el tipo de alimento; seco y fibroso. Por estos motivos, la insuficiencia gástrica, fundamentalmente de ácido clorhídrico, que a su vez y de modo reflejo repercute en una inhibición del precursor secretor intestinal, se prolonga más allá del destete, con el consiguiente aprovechamiento del alimento y por tanto del crecimiento e índices de conversión (Puchal 1984).

El 1940 Hallgren y posteriormente en 1957 Weiki (citados por Bazan 1985); habían recomendado el uso de acidificantes en dietas líquidas para lechones.

Por otro lado se ha visto que la capacidad tampon del alimento puede ser incrementada o disminuida, mediante la incorporación de aditivos alcalinizantes o acidificantes (Smith y Jones 1963; citados por Puchal 1984).

Se ha comprobado que la incorporación de acidificantes al pienso (ver cuadro A), produce una disminución de su pH, y al facilitar la difusión del ácido clorhídrico a todo el contenido gástrico permite una mayor y más rápida difusión y actuación de la pepsina sobre la proteína dietética, a nivel del estómago.

CUADRO A

Modificación del pH del pienso	
% Acidificante (*) en pienso.	pH del pienso.
0.00%	5.54
0.05%	5.52
0.10%	5.39
0.15%	5.26

(*) Acidomon, marca registrada en Lucta, S.A.

En 1946 Mollgaard (citado por Puchal 1984); demostró con claridad la diferencia de pH que se aprecia en las capas superiores, más líquidas, del contenido gástrico y las partes inferiores, más próximas al fundus del estómago.

Son varios los investigadores que estimulados por estos conocimientos han estudiado la incorporación de acidificantes al pienso de cerdos.

Así en 1973 de Vuyst et al, (citado por Puchal 1984); observan una mejora significativa del orden de 4.5% en el crecimiento diario de engorda entre 17 y 95 kg de peso vivo, y también una ligera mejora, aunque no significativa (1.5%) en el índice de conversión al incorporar 0.7% de ácido cítrico en un pienso de tipo comercial, en el que sin embargo había todavía un porcentaje de leche relativamente elevado para cerdos de engorda.

Más tarde, Kirchgessner y Roth-Mayer 1975 (citado por Puchal 1984); estudiaron la incorporación a niveles más elevados (hasta 4.5% de ácido cítrico), tanto en piensos lácteos con más de 50% de leche, como en pienso tipo indicadores, sin derivados lácteos, y con lechones destetados a los 15 días de vida; encontrando un incremento de peso diario en los lechones. (Ver Cuadro B)

CUADRO B

GRUPO	I	II	III	IV
Acido cítrico	---	0.5	1.5	4.5
Incremento diario en gramos	423	444	403	502

Estos mismos autores Kirchgesner y Roth-Mayer, 1978; citado por Puchal 1984; estudiaron la inclusión de otro ácido orgánico, el ácido fumárico, a niveles de 0.5% a 4% en raciones de destete, entre 7 y 40 kg de peso vivo, obteniendo a su vez una mejora de un 11.6% en el crecimiento diario con un 2% de ácido fumárico, en tanto que el nivel más alto redujo la mejora a tan sólo un 3.4% del crecimiento, mejorándose el índice de conversión en un 7%.

La incorporación de ácido fumárico ha sido también estudiada por otros investigadores (Brune y Pakkauf, 1978; Hoppenbrock, 1978; citado por Puchal 1984); quienes llegan a la conclusión de que la incorporación de ácido fumárico a dosis de 1.5% en dietas de lechones destetados precozmente, resulta una mejora en el crecimiento, resultando que en algunos casos se vean potencializados por la incorporación simultáneamente de antibióticos (40 mg/kg pienso en tilosina o 20 mg/kg pienso de virginiamicina) (Hoppenbrock, 1978; citado por Puchal 1984); en tanto que en otros casos, empleando tilosina no se aprecia ningún sinergismo (Brune y Pallauf 1978, citado por Puchal 1984).

Otros autores han estudiado la posible actividad de otros ácidos tales como el ácido málico, frente a los ácidos cítricos y fumáricos más conocidos.

Scipioni 1979 (citado por Puchal 1984); estudia estos productos acidificantes a las dosis de 1% de ácido cítrico, 0.7% de ácido fumárico y 0.9% de ácido málico, en bse a que los tres aditivos dieran un mismo pH (4.9) al alimento. Los resultados indican un efecto mejorador del crecimiento tan sólo con el ácido cítrico, no apreciándose diferencia en el caso del ácido fumárico, y detectándose una depresión del crecimiento en el caso del ácido málico.

Intentando profundizar en las posibles causas de la mejora detectada en el empleo de ácido fumárico a dosis de 1.5 a 2.0%, Kirchgessner y Roth-Mayer 1980 (citados por Puchal 1984); realizan una investigación sobre digestibilidad, balance nitrogenado, energético y mineral en lechones alimentados con ácido fumárico al 1% y 2%. Los resultados muestran que el ácido fumárico aumenta en un 2 a 3% así como también lo hace la energía digestible y metabolizable mediante la incorporación de ácido fumárico al pienso a niveles del 1 al 2%. Los resultados obtenidos con ácido cítrico y fumárico han estimulado la búsqueda de otros aditivos acidificantes que sin dejar de ejercer la misma acción que aquellos, fueran más económicos. En unos ensayos realizados recientemente, se comparó la efectividad de ácido fumárico y un acidificante "Acidilemon", a cerdos de 30 a 90 Kg. (Ver cuadro C).

CUADRO C

INFLUENCIA DE ACIDIFICANTES EN CERDOS EN CRECIMIENTO

	Crecimiento incr. peso mgs.	1/C	Acabado incr. peso kgs.	1/C
Control	26.5	2.551	34.0	2.776
Ac. fumárico 1.00%	26.3	2.352	36.0	2.656
Acidilemon 0.15%	26.5	2.375	32.8	2.667
Acidilemon 0.30%	26.1	2.498	33.5	2.780

No hubo diferencia significativa en cuanto al crecimiento, si bien se apreciaron valores numéricos superiores para el ácido fumárico, en tanto que al incrementar el nivel de Acidilemon, se pierde la ventaja obtenida durante la primera fase de crecimiento, quizá debido al exceso de acidez en el pienso.

Zednik y Pavlik, 1981 probaron 3 diferentes niveles de acidificantes para cerdos de engorda. (Cuadro D).

CUADRO D

Nivel de acidificante.	Ganancia Diaria, Kg
0.5%	0.605
1.0%	0.675
2.0%	0.661

En otro ensayo (Ver cuadro E), en el que se comparó la incorporación de acidlemon en dos sistemas alimentarios (ad libitum y restringido), puede apreciarse una diferencia muy significativa, tanto entre los animales alimentados con ad libitum y con los restringidos, como entre los que recibían o no el acidificante en la primera fase del crecimiento. La explicación del porque no se produjeron diferencias en cuanto a los índices de conversión, con y sin acidificantes, en este ensayo puede radicar en el hecho de que la mayor palatabilidad del pienso resultase en su mayor consumo de alimento, lo que a su vez repercutirá en un mayor peso final.

CUADRO E

INFLUENCIA DE ACIDIFICANTES Y MANEJO ALIMENTARIO

	Crecimiento (122 días vida)		Acabado (152 días vida)	
	Kgs vivo	I/C	Kgs vivo	I/C
0.15% A/Lemon, Ad lib-ad lib	66.2	2.408	91.9	2.571
0.15% A/Lemon, Restr-Restr	56.2	2.304	78.7	2.402
0.00% A/Lemon, Ad Lib-Restr	63.3	2.375	84.1	2.522

Bazan 1985; trabajó con lechones destetados de dos granjas, alimentandolos con un acidificante (ad-libitum) en el alimento, durante 15 días. En la primera granja se puede observar que no existe diferencia estadística al 5% en la ganancia de peso obtenidas entre los animales tratados y los no tratados. Sin embargo se observa que la ganancia promedio para el grupo tratado fue de 4.27 kgs contra 4.12 kgs para el grupo no tratado.

En la segunda granja se observa que el grupo tratado obtuvo una ganancia total superior a los animales no tratados que estadísticamente son significativas al 5%. Asimismo se observa que la ganancia promedio para el grupo tratado fue de 3.92 kgs contra 1.69 kgs del grupo no tratado. En este caso el incremento se atribuye a la incorporación del acidificante a la ración, su inclusión en el pienso produce una disminución del pH, la explicación está en que el pepsinogéno precursor de la pepsina es activado en medio ácido lentamente a valores de pH alrededor de 4 y más rápidamente a pH más bajo (Dukes 1970, Ganon 1980, Guardiola 1977, Puchal 1984).

1.42 Uso de vinagre y limón

Con lo referente al uso de vinagre (cuyo principio activo es el ácido acético), diversos autores han trabajado con el vinagre, para aminorar la presencia de diarreas en los lechones. Puchal 1984; menciona que una de las principales causas de diarrea en lechones es la presencia de E. coli la cual coloniza al intestino con un pH entre 5 y 6. Esto sugiere que el mecanismo de acción del vinagre administrado por vía oral, disminuye el pH del estomago y duodeno evitando así que se adhiera E. coli disminuyendo con esto la presencia de diarrea en los lechones.

Mendoza et al 1986: utilizaron ácido acético (0.5% de dos fuentes comerciales (A y B) y jugo de limón (C). Se formaron 3 grupos de 7 camadas de lechones recién nacidos cada uno y se les administró por vía oral 5 ml de A, B y C respectivamente. Los grupos tratados con estos acidificantes, mostraron reducción estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en la presentación de diarreas como sigue: tratamiento "A" dió un 77%, tratamiento "B" dió 85% y el tratamiento "C" con un 81%. No se encontraron diferencias significativas en ganancia de peso y mortalidad en las tres semanas de observación. Los acidificantes mantuvieron el pH entre 2.3 y 3.0 congelados a -15°C por 200 días o en refrigeración a 4°C durante 75 días, demostró que es factible su conservación en condiciones de campo.

La reducción de las diarreas podría deberse a la acidificación temprana del tracto digestivo, que impide la colonización por gérmenes patógenos (E.coli). (Mendoza et al 1986), y/o a la estimulación de la absorción de inmunoglobulinas del calostro, lo que aumentaría la inmunidad pasiva transferida por la madre. (Smith et al 1968; Vega et al 1986).

Romero y Ambriz 1987: usaron vinagre en dilución 1:5, 1:10 y 1:20, en agua destilada, mostrando un porcentaje de diarreas de 5.8, 6.2 y 10.5 respectivamente, mientras que el grupo testigo fue 21.9.

Respecto a la ganancia de peso, el grupo testigo obtuvo una medida de 5.750 kg mientras que en el grupo de vinagre 1:5 fue de 5.093 kg, en el grupo de vinagre 1:10 fue de 4.720 kg y en el grupo de 1:20 fue de 5.035 kg, no existiendo diferencia estadísticamente significativa para ninguna de los grupos, lo que concuerda con estudios realizados por Morilla et al 1986.

Romero y Aariz 1987; encontraron que la concentración en la que se obtuvieron mejores resultados para la disminución de las diarreas fue la de 1:5, no encontrándose efecto del vinagre sobre la mortalidad de los lechones, durante la lactancia.

1.5 Prueba de asa ligada de conejo

En una prueba que ya quedó establecida para la determinación de enteropatógenidad de diferentes clases de microorganismos (Smith y Halls, 1967). El animal más usado es el conejo, pero se aconseja efectuarlo en animales de donde proviene la cepa a probar. (Smith y Halls, 1967). En el caso de usar cerdos éstas varían mucho en la susceptibilidad, lo mismo que sus intestinos presentando una mayor sensibilidad la parte anterior y menor, casi nula, en la parte posterior. Por esto se aconseja realizar la prueba descartando el primer metro del intestino y los 3 últimos metros. En el conejo descartar los primeros 45 cms (Smith y Halls, 1967). La intensidad de la reacción se ve afectada por:

- Lugar en el intestino: las asas de yeyuno en cerdos, terneros y corderos, son más sensibles que el íleon, aún cuando se presentan variaciones en la intensidad de la respuesta en asas adyacentes.

- Sensibilidad del animal empleado en la prueba: no todos los son aún cuando no es muy frecuente este hecho.

- Edad: los animales jóvenes son más sensibles que los adultos.

- Cepa: no todas son igualmente virulentas.

- Dosis: Se estableció que aproximadamente 30×10^7 microorganismos viables son suficientes.

- Tipo de toxina: la IT es más sensible a la prueba de asa ligada de conejo, pero es más demorada su reacción (18 horas), mientras que la ST es más rápida a las 8 horas (Moon y Whipp, 1971; Smith y Hall, 1967; Evans et al 1973).

2.0 OBJETIVOS

- Estudiar la eficacia de las cepas de *Lactobacillus* de origen no diarrecico, diarrecico y comercial, en la inhibición, tanto del crecimiento de E.coli enteropatógena como de su acción patógena.

- Estudiar la eficacia de acidificantes vegetales en la inhibición, tanto del crecimiento de E.coli enteropatógena como de su acción patógena.

JUSTIFICACION

Cada día va siendo más grave el problema de diarreas en los lechones, es por ello que se tratan de buscar alternativas para su control.

En el presente trabajo, se realizaron dos posibles alternativas, que son el uso de acidificantes biológicos como son las cepas de lactobacilos y los acidificantes vegetales como son el vinagre, limón y los principios activos de estos, con la finalidad de saber cuál de estas alternativas resulta ser la mejor para inhibir el crecimiento de E.coli tanto in vitro como in vivo.

3.0 MATERIAL Y METODOS

3.0 MATERIAL Y METODOS

3.1 Origen de las cepas

Se tomaron 80 muestras de heces de lechones entre 4 y 12 días de edad, de granjas con problemas de diarrea, ubicada en Cuautitlán de Romero Rubio Edo. de México; y 86 muestras de heces de otra granja sin problemas de diarrea ubicada en Cuautla, Morelos.

Las muestras fueron tomadas con hisopos rectales y transportados en medio Stuart.

También se trabajaron con seis preparados de origen comercial (Sinuberace y Sinerlac).

3.2 Cultivo e identificación de las cepas.

Las heces se sembraron en agar Rogosa (MRS) (De Man et al 1960); y se incubaron de 72 a 96 horas a 37°C con una atmósfera del 10% de CO₂.

Una vez separadas las colonias se les efectuó una coloración de Gram y una prueba de catalasa como pruebas preliminares.

Las bacterias aisladas se caracterizaron bioquímicamente, para ello se usaron los azúcares siguientes:

arabinosa, celobiosa, fructuosa, galactosa, glucosa ácida, glucosa gas, lactosa, maltosa, manitol, mannososa, melecitosa, raffinosa, salicin, sorbitol, sucrosa, trehalosa y xilosa. Todos ellos preparados al 10%.

Se uso caldo MRS modificado para carbohidratos, el cual tiene un indicador de pH (rojo de clorofenol), por medio del cual se detectó, si la bacteria necesita o no, al azúcar correspondiente.

Una vez identificadas las cepas se prosiguió a ponerlos en contacto con E. coli 08:K87K88ac, previamente estandarizado a 0.1 de absorbancia con 550 nm de longitud de onda.

3.3 Inhibición del crecimiento de E. coli

3.3.1 Inhibición del crecimiento de E. coli in vitro usando acidificantes biológicos

Se estudió la acción de los Lactobacillus sp aislados, trabajando con sus células totales y su sobrenadante, (centrifugado a 3,500 rpm por 30 minutos), trabajados con y sin pases repetidos de 72 horas de incubación cada pase.

A tubos con 6 ml de caldo soya tripticaseína tamponada (8% KH_2PO_4 y 3% NaHPO_4), se le adicionaron 0.1ml E. coli estandarizado (550 nm de longitud de onda y 0.1 de absorbancia), y 4 ml de las cepas de Lactobacillus en sus diferentes condiciones, es decir: sobrenadante con y sin pases repetidos y células totales con y sin pases repetidos.

Se incubaron 4 horas a 37°C para posteriormente efectuar el conteo de células de E. coli enteropatógeno sobrevivientes. (Método de Miles and Misra 1938).
Ver Diagrama 1 (flujo para acidificantes biológicos).

3.32 Inhibición del crecimiento de *E. coli* in vitro usando acidificantes vegetales.

En cuanto a los acidificantes vegetales se eligieron al vinagre de manzana (5% de ácido acético); vinagre de alcohol de caña (5% de ácido acético); limón; y como comparativo al ácido acético y al ácido cítrico que son el principio activo de acidez de las sustancias anteriores.

Se trabajó cada uno en su forma natural y a diferentes diluciones, usando como diluyentes; solución salina fisiológica 0.85% agua destilada y agua de la llave.

Se puso en contacto 4 ml de los acidificantes sin diluir, así como de las diferentes diluciones: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32, con cada uno de los diluyentes, frente a 0.1 ml de *E. coli* enteropatógena, todo ello en 6 ml de caldo soya tripsinaseína.

Se tomó el pH con el pH metro antes y después de las 4 horas de incubación.

Posteriormente se estudió la reducción de *E. coli* mediante el recuento en superficie (Método de Miles y Miera 1938).

Ver Diagrama 2 (Flujo para acidificantes vegetales).

3.4 Inhibición de la actividad enterotoxica en asa ligada de conejo.

Se trabajaron en asa ligada de conejo los acidificantes vegetales y los lactenacillos que tuvieran una máxima actividad de inhibir el crecimiento de E. coli in vitro.

Para la prueba se emplearon conejos de 1 a 1.5 meses de edad, fueron puestos en ayuno de 24 horas. Se anegtearon mediante la inyección con eter. El abdomen fue abierto mediante una incisión de 8 cms a lo largo de la línea alba y 5 cms abajo del diafragma, procediendo luego a localizar el intestino delgado, teniendo la precaución de descartar siempre dos espacios de 4 cms entre los segmentos donde se inculaba, con el fin de evitar el paso de líquido de un segmento a otro.

Se montaron no más de 5 muestras por animal, además de la cepa control positiva y negativa.

A los 18 horas fueron sacrificados mediante inhalación de dosis excesivo de eter. El abdomen fue abierto inmediatamente, removiendo luego el intestino delgado y anotando la cantidad de líquido de cada asa.

Se consideró como positiva la reacción cuando las asas acumulaban dos veces o más la dosis que se inculaba.

3.5 Estudios histopatológicos

Se llevaron a cabo los estudios de histopatología en las asas estudiadas en la actividad enterotóxica. Para ello se fijaron los pedazos de intestino en una solución de formalina al 10% en PBS pH 7.0. Realizándose cortes histopatológicos para ser observados al microscopio óptico, las lesiones que pueden causar los acidificantes biológicos y/o vegetales.

DIAGRAMA 1
ACIDIFICANTES BIOLÓGICOS

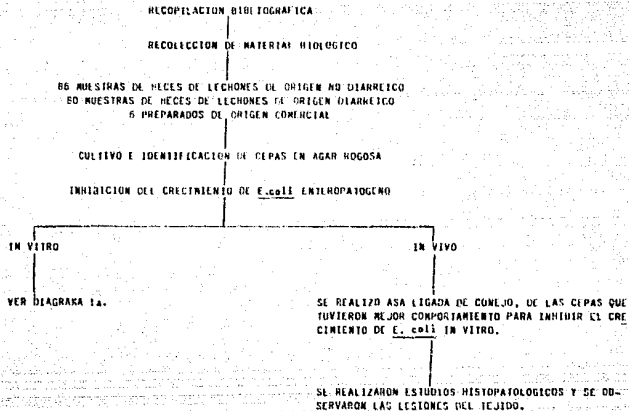


DIAGRAMA 2
ACIDIFICANTES VEGETALES.

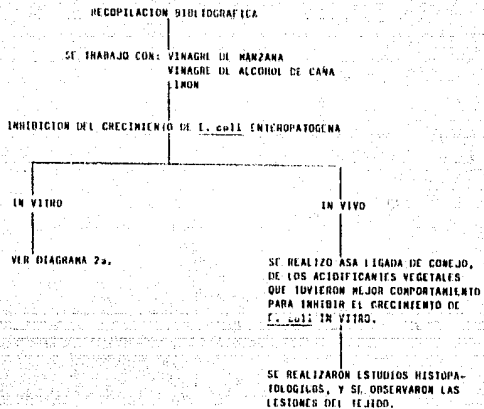


DIAGRAMA 1a

FLUJO PARA ACIDIFICANTES BIOLÓGICOS

6 ml DE CALDO SOYA TRIPITASIRA TAMPERADO.

4 ml DE CULTIVO TOTAL DE LACTOBACILLUS O
DEL SOBRENADANTE, CON PASE O SIN PASE.

0.1 ml DE E. coli ESTABILIZADO (*)

INCUBAR 4 HORAS/37°C

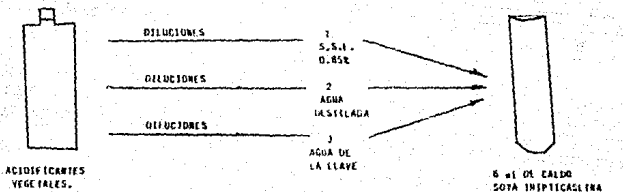
SEMIAR EN AGAR MAC CONKEY.
(Método de MILES AND MISRA)

RECuento DE E. coli A LAS
24 HORAS DE INCUBACION.

(*) 0.1 DE ABSORBANCIA Y 550 NM DE LONGITUD DE ONDA.

DIAGRAMA 2a.

FLUJO PARA LOS ACIDIFICANTES VEGETALES
USANDO DIFERENTES DILUYENTES 1, 2 y 3



(*) 0.1 DE ABSORBANCIA Y 550 NM DE
LONGITUD DE ONDA.

(*) 1:2 1:4 1:8 1:16 Y 1:32

4 ml DE CADA DILUCION
DEL ACIDIFICANTE (*)

0.1 ml DE E.coli
1:100 (*)

MEDIR pH INICIAL

INCUBAR A 37°C

MEDIR pH FINAL

SEMBRAR EN AGAR MC CONLEY
(METODO DE WILES AND WISRA)

RECuento de E. coli A LAS
24 HORAS DE INCUBACION.

4.0 RESULTADOS

4.0 RESULTADOS

4.1 Identificación de las cepas

A partir de las muestras trabajadas se aislaron 3 cepas de L. casei subespecie pseudopiantarum de origen no diarreico; de las no diarreicas se aislaron 1 cepa de L. salivarius, 1 cepa de L. delbrueckii, 1 de L. leichmanni, y 3 de L. fermentum.

De las cepas de origen comercial se aislaron 6 cepas de L. casei subespecie pseudopiantarum.
Ver cuadro 1

4.2 Inhibición del crecimiento de E. coli

4.2.1 Acidificantes biológicos

Respecto al porcentaje de inhibición de E. coli enteropatógena, frente al sobrenadante o cultivo total de los lactobacilos de diferente origen, se ve en el cuadro 2 y gráficas 1, 2 y 3 que el comportamiento más efectivo es con pases y cultivo total en el caso de las de origen no diarreico, especialmente con las cepas 20, 30, 34, 51 y 67 con 99.25%, 98.46%, 99.60%, 99.73% y 99.65% respectivamente, y en el caso de la cepa 68 con pase y sobrenadante tuvo un porcentaje de inhibición de 99.96%.

Para las de origen diarreico, su comportamiento es en general efectivo sin pases o con pases, tanto con cultivo total como con sobrenadante, donde la cepa 4c, tuvo un porcentaje de inhibición de 99.99 con sobrenadante y sin pases.

En el caso de cepas de origen comercial, en general, la condición sobrenadante-sin pase, fue la que mejor eficacia demostró en la inhibición del crecimiento de E.coli, notándose que la cepa 8, fue la mejor, dando un porcentaje de inhibición de 99.99 en la condición sobrenadante sin pase.

4.22 Acidificantes vegetales.

En el cuadro 3 y 4 se observa que el empleo de acidificantes puros, en contacto con E.coli a 0.5 y 1.0 de absorbancia, mostraron completa inhibición del crecimiento de E.coli, no habiéndose reportado variación significativa del pH al inicio y al final del experimento. En el Cuadro 5, se observan los pH obtenidos de las soluciones empleadas.

En el Cuadro 6 y Gráficos 4, 5 y 6 se puede observar que no hubo variaciones de pH drásticas, es decir el pH se mantuvo constante con los acidificantes vegetales empleadas sin importar el tipo de diluyente utilizado.

De manera general se observa que el Cuadro 7 y Gráficos 7, 8, 9, 10 y 11 se ve que la dilución mínima inhibitoria de acidificantes vegetales es 1:4, no así con el vinagre de manzana que permitió una dilución mínima inhibitoria de 1:2.

Con respecto a los diluyentes se observó que usando agua destilada hubo una mejor inhibición de E.coli no así usando SSM o agua de la llave, las cuales permitieron que creciera en mayor cantidad E.coli. Ver Cuadro 7 y 8.

En el Cuadro 9, se observa de manera general que los acidificantes vegetales tienen un buen porcentaje de inhibición de E. coli, notándose que con el limón diluido en agua de la llave tuvo un 100 por ciento de inhibición.

4.31 Acidificantes biológicos

De acuerdo a su mejor comportamiento para inhibir el crecimiento de E. coli se eligió una cepa de cada uno de los tres diferentes orígenes en sus condiciones óptimas, con la finalidad de hacer los estudios de histopatología, y observar las lesiones que pudieron ocasionarse en el intestino del conejo.

Ver Cuadro 10

En el Cuadro 11 y 12 se ve que el grado de lesión en el tejido no fue tan drástica, notándose una necrosis y congestión leve.

4.32 Acidificantes vegetales

En el estudio histopatológico con estos acidificantes se observa congestión, hemorragia severa, y cierta atrofia de las vellosidades principalmente.

Ver Cuadro 13 y 14.

En el Cuadro 15, se observa el grado de lesión de los acidificantes biológicos y vegetales, notándose que cuando se usaba E. coli en las asas, había un grado de lesión superior al comparado con las asas que no tenían E. coli además se observa que el grado de lesión fue menor con los acidificantes biológicos que con los vegetales.

4.4 Inhibición de la actividad enterotóxica

4.4.1 Acidificantes biológicos

Las cepas 68, 4c y 8 fueron las que dieron un mejor resultado in vitro (Ver Cuadro 10), por tal motivo se decidió trabajarlas in vivo, en las condiciones sin pase, con pase, cultivo total y sobrenadante.

En el Cuadro 16 y gráfica 12 se observa el porcentaje de inhibición de la actividad enterotóxica; notándose que con la condición cultivo total-sin pase hubo un 100 por ciento de inhibición, para las 3 cepas; aunque al trabajar con la condición cultivo total-con pase, también dió un 100% de inhibición, excepto con la cepa 68, que dió el 80% de inhibición.

4.4.2 Acidificantes vegetales

En el Cuadro 17 y Gráfica 13 se ve el porcentaje de inhibición de los acidificantes vegetales, observándose que con el ácido acético hubo un porcentaje de inhibición del 44% y con el ácido cítrico un 40% en contraste con los vinagres y el limón que tuvieron un porcentaje de inhibición del 8% para el vinagre de alcohol de caña; 0% para el vinagre de manzana y del 12% para el limón.

4.5 Estudio comparativo in vitro e in vivo de los acidificantes biológicos y vegetales

En el Cuadro 18, se expresan los porcentajes de inhibición, tanto del crecimiento de E. coli como de su actividad enterotóxica dada por los Lactobacillus; observándose que la cepa 68 (L. fermentum), fue eficiente en la condición con pase sobrenadante, dando un porcentaje de inhibición in vitro del 99.96%, y un 100% para los estudios in vivo, usando la condición sin pase-cultivo total.

Con la cepa 4c in vitro funcionó mejor en la condición sin pase-sobrenadante dando un 99.99% de inhibición y con un 100% para la condición cultivo total-con y sin pase, en los estudios in vivo.

De la cepa 8 en los estudios in vitro dió un porcentaje de inhibición del 99.99 para la condición sin pase-sobrenadante y un 100% para las condiciones cultivo total: con y sin pase, y con sobrenadante-sin pase, de los estudios in vivo.

En el Cuadro 19 se observa de manera general que el comportamiento in vitro usando acidificantes vegetales fue reportada una mejor inhibición del crecimiento de E. coli, no así con los estudios in vivo, donde el mayor porcentaje de inhibición fue del 44% para el ácido acético.

5.0 CUADROS

CUADRO 1
 ESPECIES DE LACTOBACILOS AISLADOS

Origen:	Género:	Especie:
DIARREICAS		
4c	<u>Lactobacillus</u>	<u>Casei subsp. pseudopiantarum</u>
5c	<u>Lactobacillus</u>	<u>Casei subsp. pseudopiantarum</u>
I30c	<u>Lactobacillus</u>	<u>Casei subsp. pseudopiantarum</u>
NO DIARREICAS		
20	<u>Lactobacillus</u>	<u>Salivarius</u>
30	<u>Lactobacillus</u>	<u>Delbrueckii</u>
34	<u>Lactobacillus</u>	<u>Leichmanii</u>
61	<u>Lactobacillus</u>	<u>Fermentum</u>
67	<u>Lactobacillus</u>	<u>Fermentum</u>
68	<u>Lactobacillus</u>	<u>Fermentum</u>
COMERCIALES		
7	<u>Lactobacillus</u>	<u>Casei subsp. pseudopiantarum</u>
8	<u>Lactobacillus</u>	<u>Casei subsp. pseudopiantarum</u>
9	<u>Lactobacillus</u>	<u>Casei subsp. pseudopiantarum</u>
9A	<u>Lactobacillus</u>	<u>Casei subsp. pseudopiantarum</u>
SN ₁	<u>Lactobacillus</u>	<u>Casei subsp. pseudopiantarum</u>
SN ₂	<u>Lactobacillus</u>	<u>Casei subsp. pseudopiantarum</u>

CUADRO 2

PORCENTAJE DE INHIBICION DE E. coli* ENT. FRENTE A SOBRENADANTE O CULTIVO TOTAL DE LACTOBACILLUS SPP. DE ORIGEN: NO DIARREICO, DIARREICO Y COMERCIAL.

No	Sp-Ct	Cp-Ct	Sp-So	Cp-So
<u>Diarreicas</u>				
20	86.60	99.25	76.40	95.00
30	89.73	98.40	63.90	88.00
34	86.60	99.60	75.00	53.60
61	75.50	99.73	29.50	96.20
67	75.50	99.65	39.70	99.20
68	87.95	98.70	28.60	99.96
<u>Diarreicas</u>				
4c	99.70	99.86	99.99	94.56
5c	99.34	99.91	99.97	98.75
130c	99.76	89.73	99.80	99.35
<u>Comerciales</u>				
7	97.90	88.90	99.97	99.23
8	99.87	60.30	99.99	98.00
9	99.87	57.15	99.89	99.97
9A	99.27	66.50	99.78	97.19
SN ₁	99.04	99.91	99.90	99.26
SN ₂	97.68	99.91	99.88	99.30

Sp Sin pase
 Ct Cultivo total
 Cp Con pase
 So Sobrenadante

*E. coli estandarizado a 0.1 de absorbancia y 550 nm.

CUADRO 3

COMPORTAMIENTO DE LOS DIFERENTES ACIDIFICANTES PUROS FRENTE
A UNA CONCENTRACION DE 0.5 DE ABSORBANCIA (*) DE *E. coli*

<u>Acidificantes</u>	<u>Recuento bacteriano</u>	<u>pH inicial-final</u>
Vinagre de Manzana	Negativo	3.6 --- 3.65
Vinagre de alcohol de caña	Negativo	3.6 --- 3.6
Ac. acético con A	Negativo	3.5 --- 3.5
Ac. acético con B	Negativo	3.55 --- 3.6
Ac. acético con C	Negativo	3.5 --- 3.6
Limón	Negativo	2.9 --- 3.0
Ac. cítrico con A	Negativo	2.9 --- 2.9
Ac. cítrico con B	Negativo	2.9 --- 2.85
Ac. cítrico con C	Negativo	2.9 --- 2.85
Control (+) con A	20.30×10^7	7.0 --- 6.35
Control (+) con B	13.10×10^7	7.25 --- 6.9
Control (+) con C	23.00×10^7	7.1 --- 6.55

(*) 550 nm de longitud de onda.

CUADRO 4

COMPORTAMIENTO DE LOS DIFERENTES ACIDIFICANTES PUROS, FRENTE
A UNA CONCENTRACION DE 1.0 DE ABSORBANCIA (*) DE E. coli.

<u>Acidificante</u>	<u>Recuento bacteriano</u>	<u>pH inicial-final</u>
Vinagre de manzana	negativo	3.55 --- 3.65
Vinagre de alcohol de caña	negativo	3.4 --- 3.6
Ac. acético con A	negativo	3.4 --- 3.55
Ac. acético con B	negativo	3.4 --- 3.6
Ac. acético con C	negativo	3.4 --- 3.65
Limón	negativo	2.8 --- 2.95
Ac. cítrico con A	negativo	2.7 --- 2.9
Ac. cítrico con B	negativo	2.8 --- 2.95
Ac. cítrico con C	negativo	2.8 --- 2.9
Control (+) con A	49.80×10^7	6.6 --- 6.1
Control (+) con B	26.90×10^7	7 --- 6.1
Control (+) con C	53.70×10^7	7.1 --- 6.25

* 550 nm de longitud de onda.

CUADRO 5

pH OBTENIDO CON CADA UNA DE LAS SOLUCIONES EMPLEADAS

<u>Solución</u>	<u>pH</u>
Vinagre de manzana	2.75
Vinagre de alcohol de caña	2.55
Acido acético diluido en SSF 0.85%	2.4
Acido acético diluido en H ₂ O destilada	2.6
Acido acético diluido en H ₂ O de la llave	2.6
Limón	2.2
Acido cítrico diluido al 5% en SSF 0.85%	1.9
Acido cítrico diluido al 5% en H ₂ O destilada	2.1
Acido cítrico diluido al 5% en H ₂ O de la llave	2.1
Caldo soya tripticaseína tamponado	6.5
Caldo soya tripticaseína	7.0
Caldo Rogosa	6.1
<u>E.coli</u> estandarizado a 0.1 de abs a 550 nm	7.0

CUADRO 6

pH INICIAL Y FINAL DE LOS ACIDIFICANTES VEGETALES EN LAS DIFERENTES DILUCIONES.

	1:2	1:4	1:8
Vinagre de manzana con A	3.6 - 3.7	3.85 - 4.0	4.5 - 4.45
Vinagre de manzana con B	3.65- 3.75	3.9 - 4.0	4.1 - 4.2
Vinagre de manzana con C	3.9 - 3.9	4.2 - 4.2	4.5 - 4.5
Vinagre de alcohol de caña con A	3.55- 3.7	3.75 - 3.9	4.1 - 4.2
Vinagre de alcohol de caña con B	3.5 - 3.7	4.1 - 4.2	4.2 - 4.3
Vinagre de alcohol de caña con C	3.55- 3.7	3.85 - 4.0	4.2 - 4.4
Acido acético con A	2.9 - 3.1	4.05 - 4.1	4.35- 4.35
Acido acético con B	3.6 - 3.7	4.05 - 4.1	4.4 - 4.4
Acido acético con C	3.5 - 3.7	4.1 - 4.15	4.4 - 4.4
Limon con A	3.3 - 3.1	3.4 - 3.55	4.05- 3.9
Limon con B	3.35- 3.2	3.55 - 3.5	4.0 - 3.95
Limon con C	3.15- 3.05	3.45 - 3.4	4.05- 3.9
Acido cítrico con A	3.2 - 3.25	3.5 - 3.9	4.15- 4.1
Acido cítrico con B	3.2 - 3.25	3.6 - 3.95	4.0 - 4.25
Acido cítrico con C	3.25- 3.25	3.7 - 4.15	4.2 - 4.3

CUADRO 7

DILUCION MINIMA INHIBITORIA DEL E. coli (*) CON ACIDIFICANTES VEGETALES EN DIFERENTES DILUYENTES.

	1/2	1/4	1/8	1/16	
Vinagre de Manzana	A	100	1800	13450	In
	B	---	850	7700	In
	C	---	2750	11450	In
Vinagre de alcohol de caña	A	---	---	850	9800
	B	---	---	290	13200
	C	---	---	250	11750
Ac. acético	A	---	---	13300	In
	B	---	---	700	6900
	C	---	---	2250	12650
Limón	A	---	---	3300	In
	B	---	---	450	11900
	C	---	---	---	13300
A. cítrico	A	---	---	21050	In
	B	---	---	9250	In
	C	---	500	7600	In

(*) E. coli en 550 nm y 0.1 de absorbancia

Diluyentes: A= SSF
 B= H₂O destilada
 C= H₂O de la llave

In= Incontables

CUADRO 8

VARIACION DEL CRECIMIENTO DE E.coli
USANDO DIFERENTES DILUYENTES

<u>Diluyente</u>	<u>Absorbancia</u>		
	<u>0.1</u>	<u>0.5</u>	<u>1.0</u>
Solución salina fisiológica 0.85%	4.06×10^7	20.3×10^7	49.80×10^7
Agua destilada	3.62×10^7	13.1×10^7	26.9×10^7
Agua de la llave	4.6×10^7	23.0×10^7	53.7×10^7

CUADRO 9
 PORCENTAJES DE INHIBICION DE E.coli
 FRENTE A ACIDIFICANTES VEGETALES IN VITRO

<u>Acidificantes</u>	<u>Diluyentes</u>	<u>Número de Células/ml</u> (*)	<u>Porcentaje de Inhibición</u>
Vinagre de Manzana	SSF	21520	99.47
	Agua destilada	12320	99.53
	Agua de llave	23120	99.50
Vinagre de alcohol de caña	SSF	1360	99.97
	Agua destilada	464	99.99
	Agua de llave	400	99.99
Acido Acético	SSF	21280	99.48
	Agua destilada	1120	99.96
	Agua de llave	3600	99.93
Límón	SSF	5280	99.87
	Agua destilada	720	99.98
	Agua de llave	0	100.00
Acido cítrico	SSF	33680	99.18
	Agua destilada	14800	99.44
	Agua de llave	12160	99.74
Control positivo:	SSF 0.85% -----	4.06×10^7	
	Agua dest. -----	2.62×10^7	
	Agua llave -----	4.60×10^7	

(*) Estos datos se obtuvieron en base a la dilución 1:8

CUADRO 10

ELECCION DE CEPAS DE MAYOR INHIBICION
DEL CRECIMIENTO DE E. coli IN VITRO.

<u>Origen</u>	<u>Cepa</u>	<u>Bacteria</u>	<u>Porcentaje de Inhi-</u> <u>bición del crecimien-</u> <u>to de E. coli.</u>
No diarreica	68	<u>L. fermentum</u>	99.96 Cp-So
Diarreica	4c	<u>L. casei sub.</u> <u>pseudoplatantarum</u>	99.99 Sp-So
Comercial	8	<u>L. casei sub.</u> <u>pseudoplatantarum</u>	99.99 Sp-So

Sp ----- Sin pase
 Ct ----- Cultivo total
 Cp ----- Con pase
 So ----- Sobrenadante

CUADRO 11

RESULTADOS DE HISTOPATOLOGIA E INHIBICION ENTEROTOXICA,
EN ASA LIGADA DE CONEJO, USANDO ACIDIFICANTES BIOLÓGICOS.

<u>Cepa</u>	<u>Volumen:</u> <u>Inicial-Final</u>	<u>Grado de</u> <u>Lesión</u>
<u>Cepa 8- So-Sp</u> Necrosis de algunas células de las vellosidades, presencia de algunas bacterias azules en la superficie epitelial, congestión leve de las vellosidades. Lesión leve.	2.0 --- 2.0	+/-
<u>Cepa 6B So-Cp</u> Necrosis de algunas células de las vellosidades, presencia de algunas bacterias azules en la superficie epitelial, congestión leve de las vellosidades. Lesión leve.	2.0 --- 2.0	+/-
<u>Cepa 4c So-Sp</u> Necrosis de algunas células de las vellosidades, presencia de algunas bacterias azules en la superficie epitelial. Congestión y edema moderado de las vellosidades. Lesión leve.	2.0 --- 2.0	+
Control positivo. Congestión severa material necrótico en la luz.	2.0 --- 5.0	+
Control negativo. Sin cambios patológicos aparentes	2.0 --- 2.0	+

CUADRO 12

RESULTADOS DE HISTOPATOLOGIA E INHIBICION ENTEROTOXICA,
 EN ASA LIGADA DE CONEJO, USANDO ACIDIFICANTES
 BIOLOGICOS + E. coli

	<u>Volúmen:</u> <u>Inicial-Final</u>	<u>Grado de</u> <u>Lesión</u>
<u>Cepa 8 So-Sp + E.coli estandarizada (&)</u> Necrosis de células epiteliales e infiltración de PMN en la mucosa; infiltración mononuclear y polimorfonuclear en lámina propia de las vellosidades, congestión leve de las vellosidades. Lesión moderada.	2.5 - (-)	++
<u>Cepa 68 So-CP. + E.coli estandarizada (&)</u> Necrosis de células epiteliales e infiltración de PMN en la mucosa; infiltración mononuclear y polimorfonuclear en lámina propia de las vellosidades, congestión leve de vellosidades. Lesión moderada.	2.5 -0.4	++
<u>Cepa 4c So-Sp + E.coli estandarizado (&)</u> Necrosis y atrofia moderada de las vellosidades, presencia de colonias bacterianas en la submucosa, infiltración mononuclear en submucosa, congestión y hemorragia en mucosa y submucosa. Lesión severa.	2.5 - 4.5	+++
Control positivo Congestión severa, material necrótico, en la luz	2.5 - 5.0	+
Control negativo. Sin cambio patológicos aparentes.	2.5 - (-)	-

(&) 550 nm de longitud de onda a 0.1 absorbancia

CUADRO 13
 RESULTADOS DE HISTOPATOLOGIA E INHIBICION ENTEROTOXICA
 USANDO ACIDIFICANTES VEGETALES, EN ASA LIGADA
 DE CONEJO

	<u>Volumen:</u> <u>Inicial-final</u>	<u>Grado de</u> <u>lesión</u>
Vinagre de alcohol de caña puro. Congestión severa y hemorragia severa en submucosa, migración leucocitaria epitelial, fibrina e infiltración de PMN en la luz intestinal.	2.0 -- 2.0	++
Vinagre de manzana puro. Congestión y hemorragia severa, atrofia moderada de vellocidades, migración leucocitaria epitelial, fibrina e infiltración de PMN severa en la luz intestinal (infiltración severa)	2.0 -- 2.0	+++
Acido acético al 5% en H ₂ O destilada. Sin cambios patológicos.	2.0 -- 2.0	-
Limón puro. Atrofia severa de vellocidades, congestión y hemorragia severa, infiltración de PMN en submucosa y mucosa. (Infiltración severa)	2.0 -- 2.0	++++
Acido cítrico al 5% en H ₂ O destilada. Atrofia moderada de vellocidades, congestión severa, infiltración de PMN en mucosa y submucosa.	2.0 -- 2.0	+++
Control positivo. Congestión severa, material necrótico en la luz intestinal.	2.0 -- 5.0	+
Control negativo. Sin cambios patológicos aparentes.	2.0 -- 2.0	-

CUADRO 14

RESULTADOS DE HISTOPATOLOGICA E INHIBICION ENTEROTOXICA,
EN ASA LIGADA DE CONEJO, USANDO ACIDIFICANTES
VEGETALES + E. coli

	<u>Volumen</u> <u>Inicial-Final</u>	<u>Grado de</u> <u>Lesión</u>
Vinagre de alcohol de caña puro + 1 ml de <u>E. coli</u> estandarizado (4) Necrosis de algunas porciones del epitelio intestinal, infiltración mononuclear moderada, hemorragia leve en vellicidades.	2.5 -- 4.6	++
Vinagre de manzana puro + 1 ml de <u>E. coli</u> estandarizado (4) Necrosis total de mucosa y submucosa, hemorragia severa, infiltración de PMN y mononucleares severa.	2.5 -- 6.8	++++
Acido acético 5% en H ₂ O destilada + 1 ml de <u>E. coli</u> estandarizado (4) Atrofia severa de vellicidades y necrosis total de la mucosa, hemorragia severa, infiltración severa de PMN y mononucleares.	2.5 -- 2.8	++++
Limon puro + 1 ml de <u>E. coli</u> estandarizado (4) Atrofia severa de vellicidades, necrosis epitelial, hemorragia severa en lámina propia.	2.5 -- 4.4	++++
Acido cítrico 5% en H ₂ O destilada + 1 ml de <u>E. coli</u> estandarizado (4) Atrofia severa y necrosis de algunas vellicidades, hemorragia severa, infiltración de PMN severa.	2.5 -- 3.0	++++
Control positivo. Congestión severa, material necrótico en la luz.	2.5 -- 5.0	+
Control negativo. Sin cambios patológicos aparentes	2.5 -- 2.5	-
(4) 950 nm de longitud de onda a 0.1 absorbancia		

CUADRO 15

GRADO DE LESION DE LOS ACIDIFICANTES
BIOLOGICOS Y VEGETALES

<u>Acidificantes Biológicos</u>	<u>Grado de lesión sin E. coli</u>	<u>Grado de lesión con E. coli</u>
8 Sp-So.	+/-	2+
68 Cp-So.	+/-	2+
4c Sp-So.	+	3+
 <u>Acidificantes Vegetales</u>		
Vinagre de alcohol de caña	2+	2+
Vinagre de manzana	3+	5+
Acido acético	-	5+
Limón	4+	5+
Acido cítrico	3+	4+

Grado de lesión de control positivo (+)

Grado de lesión de control negativo (-)

CUADRO 16

PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENTEROTOXICA
USANDO ACIDIFICANTES BIOLÓGICOS
EN SUS DIFERENTES CONDICIONES

CEPA	CONDICIONES			
	<u>So - Sp</u>	<u>So - Cp</u>	<u>Ct - Sp</u>	<u>Ct - Cp</u>
8	100	10	100	100
68	94	92	100	80
4c	10	20	100	100

Control positivo 0%

CUADRO 17

PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENTEROTOXICA
USANDO ACIDIFICANTES VEGETALES

Vinagre de alcohol de caña	8%
Vinagre de manzana	0%
Acido acético	44%
Limón	12%
Acido cítrico	40%
Control positivo	0%

CUADRO 18

COMPARACION DEL COMPORTAMIENTO DE LOS ACIDIFICANTES
BIOLOGICOS IN VITRO E IN VIVO.

<u>CEPA</u>	<u>CONDICION</u>	<u>PORCENTAJE DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE <u>E.coli</u> IN VITRO</u>	<u>PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENTERO- TOXICA IN VIVO.</u>
68	Sp-Ct	87.95	100
	Sp-So	28.60	94
	Cp-Ct	98.70	80
	Cp-So	99.96	92
4c	Sp-Ct	99.70	100
	Sp-So	99.99	10
	Cp-Ct	99.86	100
	Cp-So	94.56	20
8	Sp-Ct	99.87	100
	Sp-So	99.99	100
	Cp-Ct	60.30	100
	Cp-So	98.00	10

Sp Sin pase
 Ct Cultivo total
 Cp Con pase
 So Sobrenadante

CUADRO 19

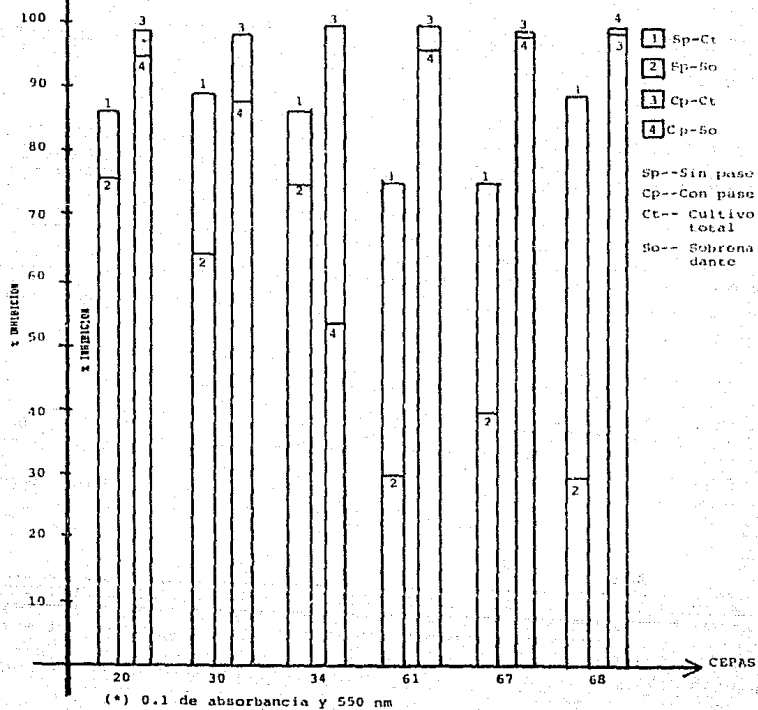
COMPARACION DEL COMPORTAMIENTO DE LOS ACIDIFICANTES
VEGETALES PUROS IN VITRO E IN VIVO

	<u>PORCENTAJE DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE E.coli IN VITRO</u>	<u>PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENTERO- TOXICA IN VIVO</u>
Vinagre de Manzana	99.53	8
Alcohol de caña	99.99	0
Acido acético	99.96	44
Lirón	99.98	12
Acido cítrico	99.44	40

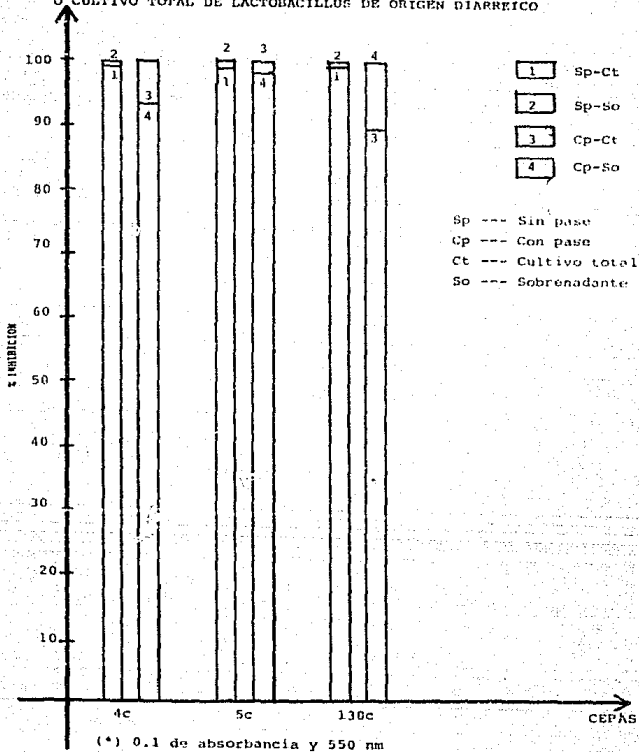
6.0 GRAFICAS

GRAFICA 1

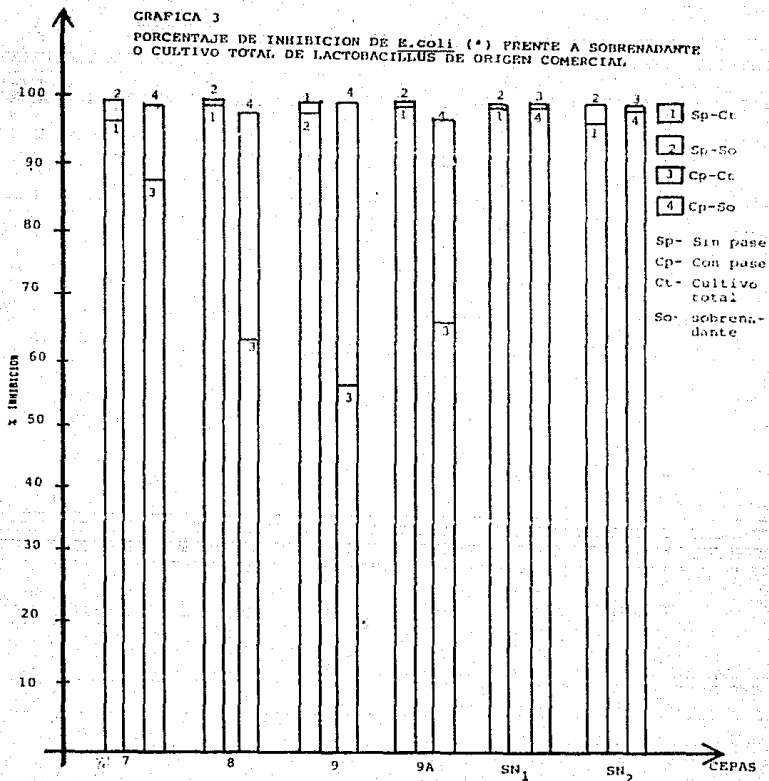
PORCENTAJE DE INHIBICION DE *E. coli* (*) FRENTE A SOBRENADANTE
O CULTIVO TOTAL DE LACTOBACILLOS DE ORIGEN NO DIARRICO.



GRAPICA 2.
 PORCENTAJE DE INHIBICION DE E.coli (*) FRENTE A SOBRENADANTE
 O CULTIVO TOTAL DE LACTOBACILLUS DE ORIGEN DIARREICO



GRAFICA 3
 PORCENTAJE DE INHIBICION DE E.coli (*) PRENTE A SOBRENADANTE
 O CULTIVO TOTAL DE LACTOBACILLUS DE ORIGEN COMERCIAL.



(*) 0.1 de absorbancia y 550 nm.

GRAFICA 4

VARIACION DE pH DURANTE EL TIEMPO
DE CONTACTO CON E.coli (*)

Enfrentado con vinagre y ácido acético

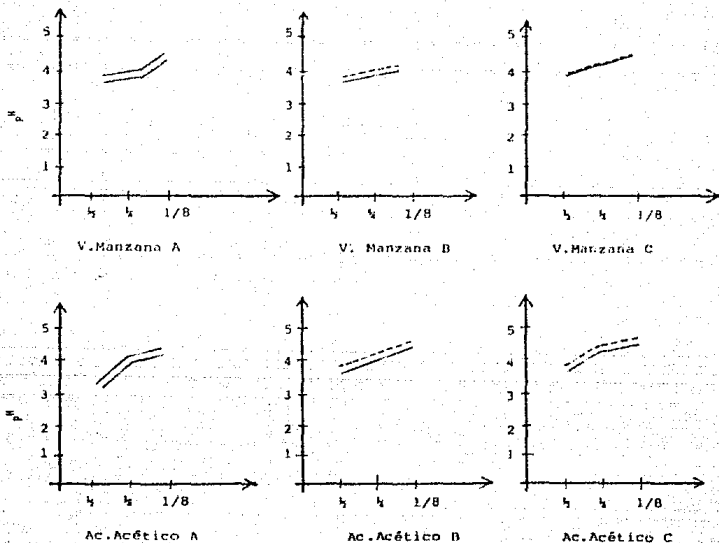
— Inicial

- - - Final

A SSP

B H₂O destilada

C H₂O llave



(*) 0.1 de absorbancia y 550 nm

GRAFICA 5

VARIACION DE pH DURANTE EL TIEMPO
DE CONTACTO CON E.coli (*)

Enfrentado con vinagre y ácido acético

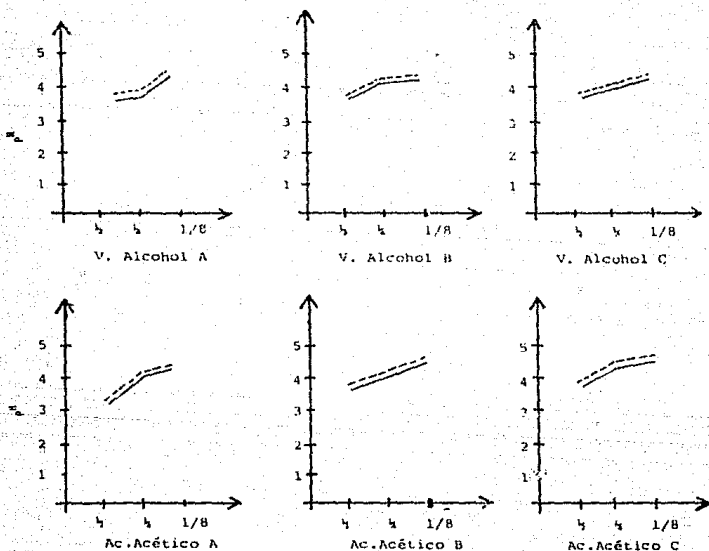
— INICIAL

- - - FINAL

A SSF

B H₂O destilada

C H₂O llave



(*) 0.1 de absorbancia y 550 nm

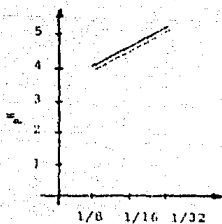
GRAFICA 6

VARIACION DEL pH DURANTE EL TIEMPO
DE CONTACTO CON *E.coli* (*)

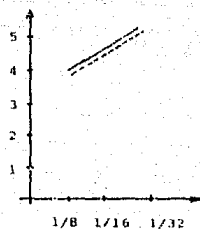
Enfrentado con limón y ácido cítrico

—— INICIAL
- - - FINAL

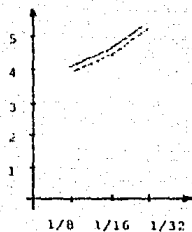
- A BPF
B H₂O Destilada
C H₂O llava



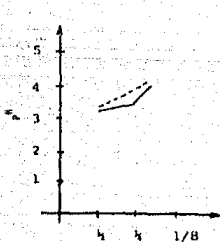
LIMON A



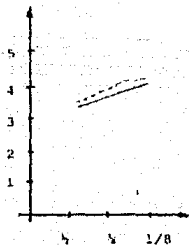
LIMON B



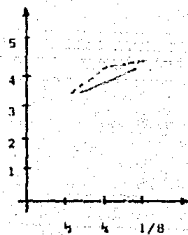
LIMON C



Ac. Cítrico A



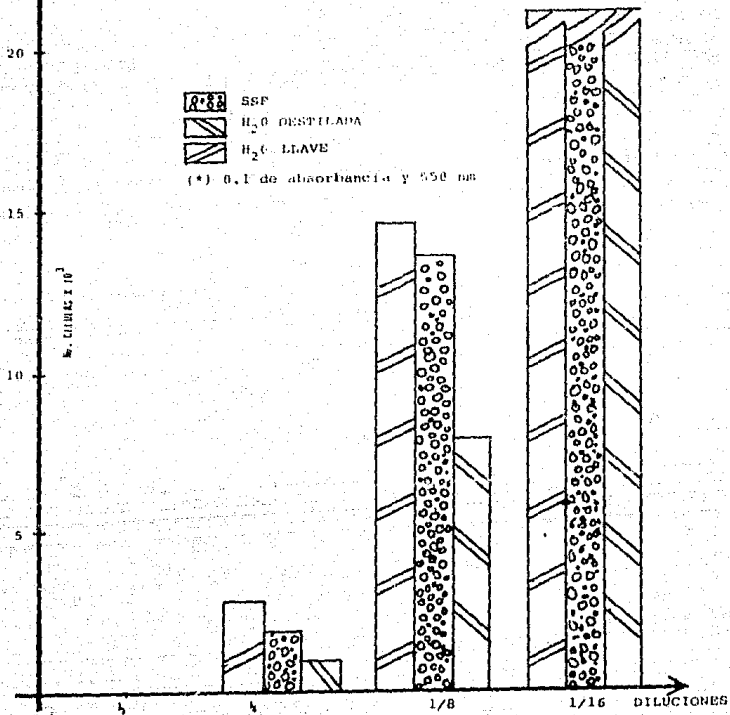
Ac. Cítrico B



Ac. Cítrico C

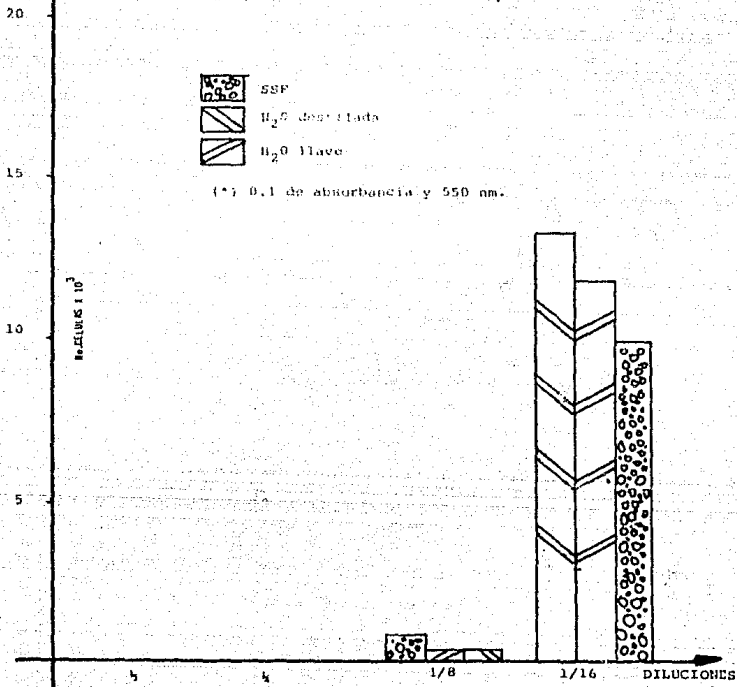
(*) 0.1 de absorbancia y 550 nm

GRAFICA 7
 DILUCION MINIMA INHIBITORIA DE E. COLI (*)
 CON VINAGRE DE MANZANA EN DIFERENTES DILUYENTES.

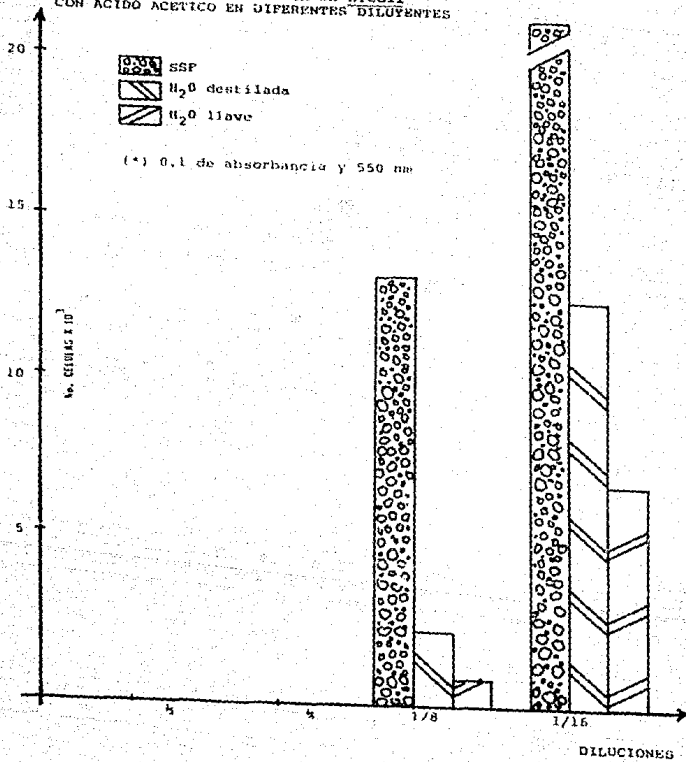


GRAPICA B

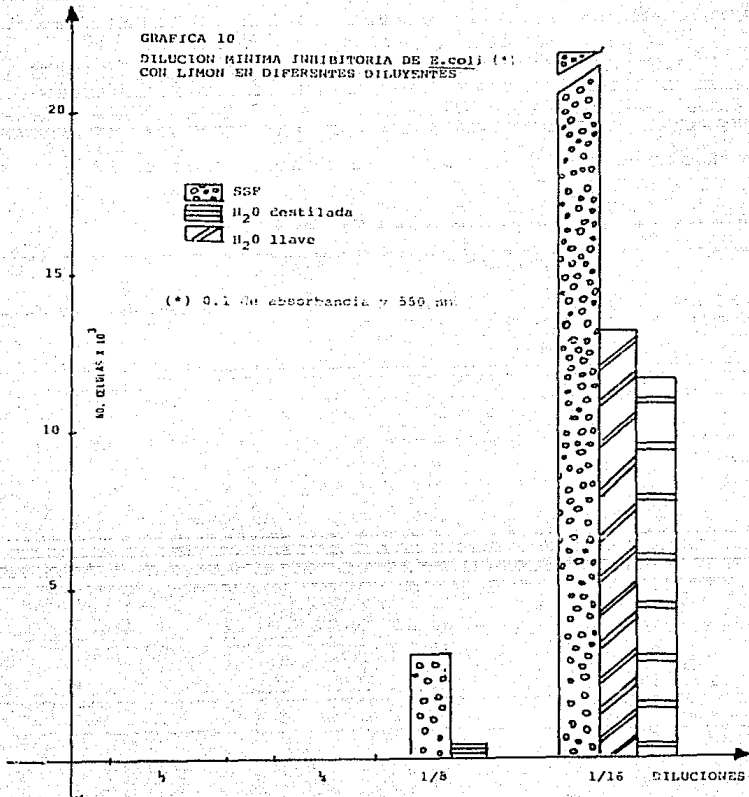
DILUCION MINIMA INHIBITORIA DE *E.coli* (*)
 CON VINAGRE DE ALCOHOL DE CAÑA EN DIFERENTES DILUYENTES



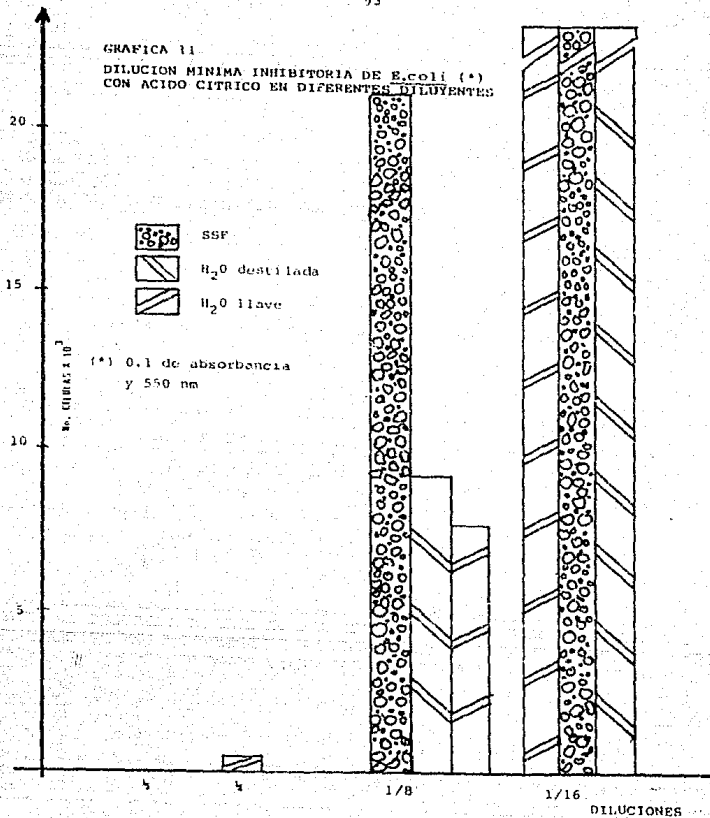
GRAPICA 9
 DILUCION MINIMA INHIBITORIA DE E.coli
 CON ACIDO ACETICO EN DIFERENTES DILUYENTES



GRAFICA 10
 DILUCION MINIMA INHIBITORIA DE *E. coli* (*)
 CON LIMON EN DIFERENTES DILUYENTES



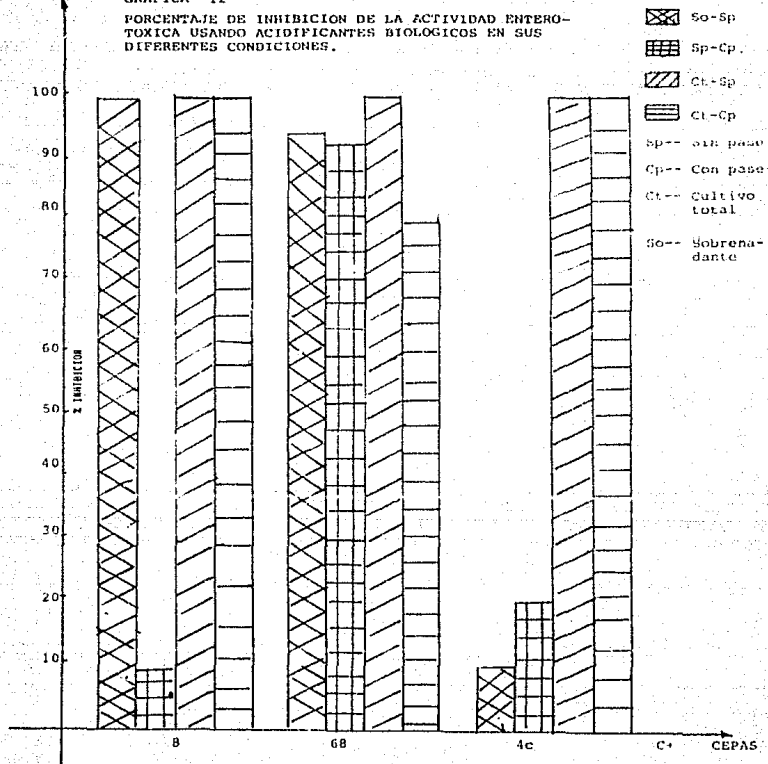
GRAFICA 11
 DILUCION MINIMA INHIBITORIA DE E.coli (*)
 CON ACIDO CITRICO EN DIFERENTES DILUYENTES



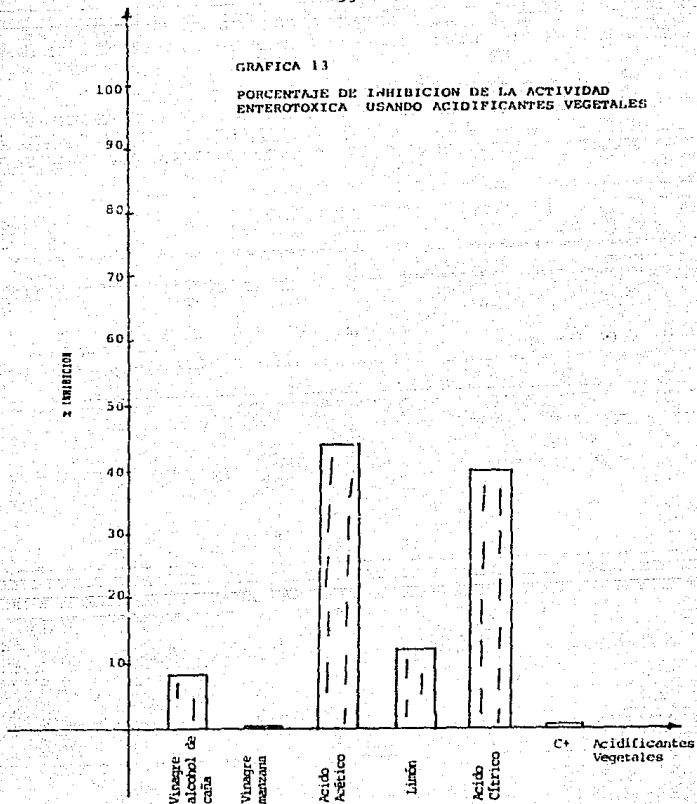
DILUCIONES

GRAFICA 12

PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENTEROTOXICA USANDO ACIDIFICANTES BIOLÓGICOS EN SUS DIFERENTES CONDICIONES.



GRAFICA 13

PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD
ENTEROTOXICA USANDO ACIDIFICANTES VEGETALES

7.0 DISCUSSION

7.0 DISCUSION

La colonización del tracto intestinal con bacterias acidificantes como es el caso de lactobacilos, es un punto importante para impedir el crecimiento de otras bacterias que pudieran ser patógenas (Sandine 1979).

En el presente trabajo se demostró que la actividad anti-E.coli por los lactobacilos, no está en función a su origen, sea este diarreico, no diarreico o comercial, sino que dicha actividad se ve relacionada con los propuestos modos de acción de los lactobacilos que consisten en: causar una disminución del pH en el tracto intestinal; producir bacteriocinas, las cuales dan actividad anti-E. coli lo que conlleva a la disminución del E. coli. (Mäyry-Mäkinen et al 1983, Mitchell y Kenworthy 1976; Gratia 1923).

La actividad similar anti-E.coli de las cepas de origen diarreico y comercial, radica en que estas tuvieron la misma especie casei subespecie pseudopiantarum, que al parecer es eficaz para inhibir poblaciones de E. coli, sin importar el origen de las cepas de lactobacilos.

Mitchell y Kenworthy 1976; estudiaron la neutralización de E. coli dada por metabolitos de L. bulgaricus y streptococcus faecium, que tuvieron actividad anti E. coli usando los cultivos de sobrenadantes para L.bulgaricus y cultivo total para S. faecium; esto está relacionado con la actividad anti-E.coli encontrado en el presente trabajo, demostrando la importancia de usar sobrenadante de cultivo de lactobacilos sin pases repetidos, que fue la condición más eficiente de los lactobacilos diarreicos y comerciales; sin embargo la condición sobrenadante- con pases, para las cepas no diarreicas, demostraron con esto que posiblemente se

requiera de la concentración de sus metabolitos para que inhiba a las poblaciones de E. coli. Ver Cuadro 10.

Los metabolitos que se encuentran en las sobrenadantes, poseen sustancias como ácido láctico, ácido fórmico, peróxido de hidrógeno y ácido acético, los cuales son bacteriocidas para varios microorganismos, y tal vez sean estas sustancias las que liberen, para tener el bloqueo en el crecimiento del E. coli (Dahiya y Speck 1968; Geopfert y Hicks 1969; Rubin y Vaughn 1979).

Posiblemente las bacteriocinas de las cepas 61 (L. fermentum), 67 (L. fermentum) y 68 (L. fermentum), de origen no diarreico, tengan un comportamiento semejante a las de L. fermentum cepa 466, trabajada por De Klerk 1967a; quien demostró este efecto en cultivos de 10 a 15 días de crecimiento.

Mäyra-Mäkinen et al 1983; demostró que el trabajar con cepas de L. fermentum, L. acidophilus y L. delbrueckii, tuvieron capacidad de adherencia a las células epiteliales columnares del intestino del cerdo, lo cual indica la posibilidad de que las cepas: 30 (L. delbrueckii), 61 (L. fermentum), 67 (L. fermentum), y 68 (L. fermentum), de origen no diarreico pudieran tener también la capacidad de adherencia al intestino del lechón, siendo mejor cuando estos se administran a temprana edad, ya que de esta manera la flora intestinal del lechón, está en proceso de transformación, y por lo tanto hay probabilidad de que se establezcan los lactobacilos. En estas circunstancias puede ser posible inducir colonización rápida en el intestino, pero en los animales adultos sin embargo, la flora posee un balance y poblaciones estables, siendo poco probable que una nueva cepa, pudiera ser capaz de establecerse por sí misma. (Cole y Fuller, 1984).

Aprovechando el efecto bacteriocida y bacteriostático de los lactobacilos se les han administrado a niños con infecciones gastroentéricas para regular la flora intestinal. (Winkelstein 1956); posiblemente se pudiera tener el mismo efecto para los animales.

Chan et al 1985; estudiaron la inhibición completa o parcial de la adherencia de uropatógenos gram negativos mediante pre-incubación a las células uroepiteliales con preparaciones de la pared celular aisladas de cepas de *Lactobacillus*; sugiriendo que el ácido lipoteicoico es responsable de la adherencia de las células uroepiteliales, pero que los impedimentos esteáricos es el mejor factor en prevenir la adherencia de uropatógenos.

En relación a los acidificantes vegetales se observa de manera general que la dilución 1:4 fue la que mejor funcionó en inhibir el crecimiento de *E.coli* enteropatógeno, dato que concuerda con lo obtenido por Romero y Ambriz 1987; quienes encontraron que la concentración de vinagre en la que obtuvieron mejores resultados para la disminución de las diarreas fue la de 1:5, no encontrándose efecto del vinagre sobre la mortalidad de los lechones, durante la lactancia.

En el presente trabajo el vinagre de alcohol de caña fue el que mejor inhibió el crecimiento de *E.coli* tomando en cuenta hasta una dilución mínima inhibitoria de 1:4; esta acción pudiera deberse a sus radicales OH, que confieren acción bactericida, y por lo consiguiente se acondiciona un medio ambiente inapropiado para que *E. coli* requiriera de un pH de 5 a 6 lo que ocasionaría la adhesión al intestino y por consecuencia la aparición de la diarrea. (Puchal 1984).

De los vinagres empleados en este trabajo, el hecho de que funcionara mejor el vinagre de alcohol de caña in vitro, es debido a que además de poseer radicales OH, posee un pH inicial de 2.55, el cual es más ácido al comparado con el vinagre de manzana que tiene un pH de 2.75.

El emplear acidificantes vegetales sin diluir, usando concentraciones de E. coli de 0.5 y 1.0 de absorbancia, se observa que no hubo crecimiento de E. coli, lo cual puede deberse a que el pH se mantuvo ácido, creando condiciones desfavorables para el crecimiento bacteriano durante las 4 horas que duró el experimento.

El empleo de agua destilada, demostró, ser el mejor diluyente que inhibió a las poblaciones de E. coli, no así el agua de la llave ni la SSP, las cuales permiten el crecimiento de E. coli.

Quizá este efecto sea debido a que la concentración de sales pertenecientes al agua de la llave y a la SSP, propicie un medio iónico, y con ello favorezcan el crecimiento de E. coli; no así el agua destilada ya que por contener poca concentración de sales disueltas, no se interfiere la acción del medio ácido sobre la bacteria y se bloquea el crecimiento de E. coli. En los resultados de histopatología se demostró el daño que provocan los acidificantes vegetales en el intestino del conejo, que son de considerarse, aunque no son concluyentes, ya que el inóculo dura mucho tiempo en contacto con el tejido, por lo que será conveniente hacer el estudio por vía oral en lechón y ver el tipo de lesión provocando, es comparable al encontrado por este estudio.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la actividad enterotóxica; se observa que los acidificantes biológicos elegidos in vitro, fueron más eficientes para inhibir a la toxina de E. coli que los acidificantes vegetales, dando valores del 100% de inhibición con la condición cultivo total-sin pasa, demostrando con ello que la actividad de las bacteriocinas no funciona en este caso, y que posiblemente sea otro modo de acción u otras sustancias que se encuentren en el cultivo total, las que influyan para inhibir la actividad enterotóxica.

Posiblemente los acidificantes vegetales, no posean la capacidad de bloquear a la toxina de E. coli, sino que su función está en base a que descienden el pH. Sin embargo los principios activos del limón y los vinagres (ácido cítrico y ácido acético); son más eficientes para inhibir a E. coli. Tal vez eso porque están en forma pura, y no interfieren los otros componentes presentes en el vinagre y el limón.

Ver gráfica 13 y cuadro 17.

8.0 CONCLUSION

8.0 CONCLUSION

La mortalidad por diarreas representan una pérdida importante para cualquier explotación porcina. Existe la posibilidad de que en nuestro país alcance cifras muy altas y por consiguiente una grave pérdida para la economía nacional, es por ello que se hace hincapié en la necesidad de estudiar alternativas para poder controlar este problema.

En este trabajo se reporta que el empleo de sobrenadante-sin pase de los lactobacilos de origen diarreico y comercial, fueron los que mejor inhibieron el crecimiento de E. coli de los estudios in vitro, esto radica en que la especie de estos lactobacilos fue la misma cepa: L. casei subespecie pseudoplantarum, lo cual sugiere que la actividad de sus bacteriocinas producen mayor protección hacia las diarreas por E. coli.

La condición con pase para cultivo total y sobrenadante, para los lactobacilos no diarreicos en los estudios in vitro, fue la que demostró mayor actividad anti-E. coli.

Por lo expuesto anteriormente, se debe estudiar cada cepa por separado, cuando se quiera emplear con fines profilácticos. El usar medio tamponado para acidificantes biológicos fue diseñado para que el pH no influyera en la inhibición de E. coli, por lo que se piensa fueron las bacteriocinas que se hayan en el sobrenadante las que actuaron para inhibir a E. coli, y esto se corrobora en este trabajo, ya que fueron los sobrenadantes los que mejor funcionaron en la actividad anti E. coli, en los estudios in vitro.

Referente al uso de vinagre de alcohol de caña, ácido acético, limón y ácido cítrico, se demostró que la dilución 1:4 fue la dilución mínima inhibitoria que mata a E. coli enteropatógena, mientras que con el vinagre de manzana la dilución fue 1:2, eligiendo el agua destilada como diluyente favorable en los experimentos.

El empleo de acidificantes biológicos y vegetales, usadas in vitro, confieren resultados de inhibición favorables, no así con los resultados in vivo, donde los acidificantes biológicos fueron los mejores, ya que no causaban lesiones en los tejidos y siendo conveniente usarlos siempre con el cultivo total-sin pase para que ejerzan su efecto tanto la células como las bacteriocinas que pudieran estar presentes en el cultivo total.

De los estudios de histopatología se comprobó que las lesiones causadas por los acidificantes vegetales eran más severas, que las de los acidificantes biológicos, ya que estos no sólo tienen la capacidad de bajar el pH, como lo hacen los acidificantes vegetales, sino tienen la capacidad de adherirse y colonizar el tracto intestinal del lechón, ya que son de especie específicos, y benéficas al organismo, además de que producen sustancias antibióticas, como son las bacteriocinas, las cuales son capaces de actuar contra E. coli bloqueando su desarrollo.

Se requiere que el uso de vinagres y limón, se use controlando su concentración, ya que de lo contrario, cuando este lechón sea grande probablemente tendrá problemas de asimilación de alimentos, provocando con esto un menor rendimiento de ganancia de peso para el porcicultor.

Es por ello que se recomienda de preferencia la administración de lactobacillus vivos, trabajados con su cultivo total con y sin pases repetidos para la prevención de las diarreas, por haber sido estas condiciones las que mejor funcionaron in vivo, ya que en cierto momento pudieran ser aplicadas como probióticos a nivel de granjas, y con ello controlar el índice de diarreas debidas a E. coli.

9.0 APENDICE

9.0 APENDICE

Parte A.

AGAR ROGOSA

Constituyentes de Agar Rogosa.

Extracto de carne	2.5g
Extracto de levadura	1.25g
Acido Arcorbico	0.25g
Peptona de soya	2.5 g
Polipeptona	2.5 g
Acetato de sodio anhidro	1.5 g
Agar bacteriológico	5.5 g

Colocarlos en 450 ml de agua destilada, y esterilizar a 121°C x 15' y 15 libras de presión.

Parte B

Lactosa 2.5g

Colocarlos en 50 ml de agua destilada, y esterilizar a 10 libras de presión x 15'

Mezclar la Parte A y la parte B, y servir en cajas de petri estériles.

CALDO ROGOSA

Parte A.

Constituyentes del Caldo Rogosa.

Extracto de carne	2.5g
Extracto de levadura	1.25g
Acido Ascorbico	0.25g
Peptona de soya	2.5g
Polipeptona	2.5g
Acetato de sodio anhidro	1.5g

Colocarlos en 450 ml de agua destilada, y esterilizar a 121°C x 15' y 15 libras de presión.

Parte B

Lactosa 2.5 g

Colocar lo en 50 ml de agua destilada, y esterilizar a 10 libras de presión x 15'.

Mezclar la parte A y la B, y servir en tubos de rosca estériles.

CALDO MRS MODIFICADO PARA CARBOHIDRATOS

Constituyentes:

Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Tween 80	1 ml
K_2HPO_4	2 g
$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	5 g
$MgSO_4 \cdot H_2O$	0.2 g
Agua destilada	1000 ml

Preparar solución al 0.2% de rojo de clorofenol, y agregar 20 ml por cada 1000 ml de caldo MRS modificado para carbohidratos, y esterilizar a 115°C x 20 g, ajustando el pH entre 6.2 -- 6.5

FORMALDEHIDO AL 10%

Parte A

Solución PBS

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
PO_4HNa_2	1.15 g
PO_4H_2K	0.2 g

Aforar a 1 litro con agua desmineralizada.

Parte B

Colocar 900 ml de soln. PBS + 100 ml de formaldehido

10. BIBLIOGRAFIA

10. BIBLIOGRAFIA

Austin-Prather, S.L., and Booth S.J. 1984. Evidence for a membrane bound form of a bacteriocin of bacteriocides uniformis T1-1. Can. J. Microbiol., 30: 268-272.

Barefoot, F.B. and Klacchammer, T.R. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus. Applied and environmental microbiology 45: 1808-1815.

Barrow, P.A., Brooker, B.E., Fuller, R. and Newport, J.J. 1980. The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and its importance in the microbiology of the intestine. J. of Applied Bacteriology, 48: 147-154.

Barrow, P.A., Tucker, J.P. 1986. Inhibition of caecum colonization of the chicken with Salmonella typhimurium by pre-treatment with strains of Escherichia coli strains. J. of Hygiene, 96: 161-169

Bazan, J.M.O. 1985. Utilización de un acidificante en la ración de lechones destetados. Tesis de Licenciatura, Fac. de Med. Vet. y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México, Cuantitlán Izcalli, Edo. de México.

Berruecos, J.M. 1965. Análisis estadísticos de la relación entre el número de lechones nacidos destetados, y el porcentaje al destete, en la raza Duroc-Jersey. Tec. Pec. Méx. 6: 35-37.

Bohl, E.H. 1979. Rotaviral diarrhea in pigs. J. Am. Vet. Med. Ass., 172: 458-463.

Brooker, B.E. and Fuller R. 1975. Adhesion of lactobacilli to the chicken crop epithelium. *J. ultrastruct. Res.* 52:21

Burnett, G.S. and Hanna J. 1963. Effect of dietary calcium lactate and lactic acid on faecal Escherichia coli counts in pigs. *Nature London* 197:815.

Chan, R.C.Y., Bruce, A.W. and Reid G. 1984. Adherence of cervical, vaginal and distal urethral normal microbial flora to human uroepithelial cells and the inhibition of adherence of gram-negative uropathogens by competitive exclusion. *J. Urol.* 131: 596-601

Chan R.C.Y., Reid G., Irwin, R.P., Bruce A.W. and Costerton J.W. 1985. Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by lactobacillus whole cells and cell wall fragments. *Infection and Immunity.* 42: 84-89

Chopra, S.L., Blackwood, A.C. and Dale D.G. 1965. Intestinal microflora associated with enteritis of early-weaned pigs. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 27: 291-294

Christian, M.K. and Baker, J.R. 1973. Observation on diseases during the first two years of operation of a large pig fattening unit. Part.1 Incidence. *Vet. Rec.* 93: 150-153

Cole, D.J.A., Beal R.M. and Gascombe J.R. 1968. The effect on performance and bacterial flora of lactic acid, propionic acid, calcium propionate and calcium acrylate in the drinking water of weaned pigs. *Vet. Rec.* 83:459

Cole, C.B. and Fuller R. 1984. A note on the effect of host specific fermented milk on the coliform population of the neonatal rat gut. *J. of Appl. Bacteriology.* 56: 495-498.

Collins B.E. 1978. Enumeration of Lactobacillus acidophilus with the agar plate count. J. of Food protection. 41: 439-442.

Coarterton, J.W., Geesey, G.G. and Cheng K.J. 1978. How bacteria stick. Sci. Amer. 238:86

Curtis, A.S.G. 1962. Cell contact and adhesion. Biol. Rev. 37:82.

Curruthers, M.M. and Anderson W. 1979. Inhibition by polyanions of adherence by Kanagawa-positive Vibrio Parahaemolyticus a physicochemical effect. J. infect. Dis. 140: 119.

Dahiya, R.S., and Speck, M.L. 1968. Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on Staphylococcus aureus. J. Dairy Sci; 51:1568

Davidson, J.B. and Birch, D.G. 1976. Bacterial competition as a means of preventing neonatal diarrhoea in pigs. Infection and Immunity 13: 1273-1274.

De Klerk H.C. 1967a. Bacteriocinogeny in Lactobacillus fermenti Nature. 214:609

De Klerk H.C. 1967b. Properties of a Lactobacillus fermenti bacteriocin. J. Gen. Microbiol. 48: 309-316

De Klerk H.C. Coersse J.N. 1961. Antibiosis among lactobacilli Nature. 192: 340-341

De Man, J.C., Rogosa M. and Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. of Appl. Bacteriology*. 23: 131-135

Dubos, R.J., Shaedler, R.W., Castello, R. and Hoet, P. 1965. Indigenous normal and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J. of Experimental Medicine*. 122: 67-76

Dukes. S. 1970. Fisiología de los animales domésticos. Vol. 1 pp-518-555. Editorial S.A. Madrid España.

Ellinger, D.K., Muller L.D. and Glantz P.J. 1980. Influence of feeding fermented colostrum and *lactobacillus acidophilus* on fecal flora of dairy calves. *J. of Dairy Sci.* 63: 478-482

Estrada, C.A. y Enriquez, E.C. 1983. Diagnóstico simplificado de las diarreas infecciones más comunes en los lechones. *Vet. Méx.* 14: 93-102

Evans, D.C., Evans D.J. and Pierce N.F. 1973. Differences in the response of rabbit small intestine to heat labile and heat stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 7: 873-880

Flores, T.J. 1984. Estudio comparativo de la presentación de diarreas en cerdos lactantes, en una granja localizada en el Estado de México. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoo., Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.

Francis, C. Janky, D.M., Arafa, A.S., and Harms R.H. 1978. Interrelationship of *Lactobacillus* and zinc bacitracin in the diets of turkey poults. *Poultry Sci.* 57: 1687.

Fuller, R. 1973. Ecological studies on the lactobacillus flora associated with the crop epithelium of the fowl. J. Appl. Bacteriol. 36: 131.

Fuller, R. 1977. The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop Brit. Poultry Sci. 18:85.

Fuller, R. 1978. Epithelial attachment and other factors controlling the colonization of the intestine of the gnotobiotic chicken by lactobacilli. J. of appl. bacteriol. 45:389-395

Fuller, R. 1986. Probiotics. J. of Appl. Bacteriol. Symposium supplement. 61:1-7

Fuller, R. and Brooker, B.E. 1980. The attachment of bacteria to the squamous epithelial cells and its importance in the microecology of the intestine. In microbial adhesion to surfaces, ed. Berkeley, R.C.W., Lynch, J.M., Melling, J. Butter, P.E. and Vincent, B. pp-495-507. Chichester: Ellis Horwood Ltd.

Ganon, W. 1980. Manual de Fisiología Médica. Séptima Edición. Ed. El Manual Moderno, México, D.F. pp-320-333.

Gilliland, S.E., Bruce B.B., Bush L.J. and Staley T.E. 1980. Comparison of two strains of Lactobacillus acidophilus as dietary adjuncts for young calves. J. Dairy Sci. 63: 964-972.

Gilliland, S.E., Speck, M.C., Nauyok, G.P. Jr., and Giesbrecht F.C. 1978. Influence of consuming nonfermented milk containing Lactobacillus acidophilus in faecal flora of healthy males. J. Dairy Sci. 61:1.

Gordon, D., Macrae, J., and Wheeler, D.M. 1957. A Lactobacillus preparation for use with antibiotics. Lancet, 272: 899-901.

Gratia, A. 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacile. Com. Rend. 23:1040-1041

Guardiola, C., 1977. Fisiología, bioquímica de los procesos digestivos del cerdo. Primer cuadro latinoamericano de enfermedades gastrointestinales del cerdo. ENEP Cuautitlán.

Gyles, C.L. and Barnum, D.A. 1967. Escherichia coli in ligated segments of pig intestine. J. Pathol. Bacteriol. 94: 189-194

Haley, T.J., Flecher, A.M. Vonnert, W., and Vincent, J. 1957. Beneficial effect of quinoxaline 1-4-di-N-oxide in radiation injury in mice. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 96: 579-582

Hastinen J.B., Durbin C.T. and Bernhart F.W. 1950. Hexadecanoic acid as a growth factor for lactic acid bacteria. Archives of Biochemistry, 25: 91-96

Holt, C.F. 1979. The shorter bergeys, manual of determinative bacteriology 8ed. Williams & Wilkins Company, Baltimore. pp-218-221.

Hoskins, L.C., and Zamcheck, N. 1968. Bacterial degradation of gastrointestinal mucus. I. Comparison of mucus constituents in the stools of germfree and conventional rat. Gastroenterology 54: 210-217

Ikowa, M. and Snell, E. 1960. Cell wall composition of lactic acid bacteria. *J. Biol. Chem.* 235: 1376.

Jacob, F., Iwoff, A. Simonovitch, A., and Wollman E.L. 1953. Definition de quelques termes relatifs a la lysogenie. *Ann. Inst. Pasteur.* 84: 222-224.

Joerger, C.M. and Klaenhammer, R.T., 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. of bacteriol.* 167: 439-446

Jones, J.E.T. 1969. The incidence and nature of diseases causing death in pigs aged a 7 months in a commercial herd. *Br. Vet.J.* 125: 492-503

Jones, G.W., and Rutter, J.M. 1972. Role of K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhoea caused by *Escherichia coli* in piglets. *Infection and Immunity.* 6: 918-927

Kunkamp, H.C.H., 1965. Birth and death statistics on pigs of preweaning age. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 146: 337-340

King, J.O.L. 1968. *Lactobacillus Acidophilus* as a growth stimulant for pigs. *The Veterinarian.* 5: 273-280

Klaenhammer, T.R., and Kleeman, E.G. 1981. Growth characteristics, bile sensitivity and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus* *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1461.

Kleeman, E.G., and Klaenhammer, T.R. 1982. Adherence of *Lactobacillus* species to human fetal intestinal cells. *J. Dairy. Sci.* 65: 2063-2069

- Kodicek, E. and Worden, A.N. 1945. The effect of unsaturated acids on Lactobacillus helveticus and other gram-positive micro-organisms. The biochemical J. 39: 78-85
- Kohler, E.M. and Bohl, E.H. 1964. Prophylaxis of diarrhea in newborn pigs, J. Am. Vet. Med. Ass., 144: 1294.
- Kotarski, S.F. and Savage, D.C. 1979. Models for study of the specificity by which indigenous lactobacilli adhere to murine gastric epithelia. Infect. Immun. 26: 968
- Mäyra-Mäkinen A., Manninen, M. and Gyllenberg H. 1983. The adherence of lactic acid bacteria to the epithelial cells of pigs and calves J. of Appl. Bacteriol. 55: 241-245.
- McNulty, M.S. 1980. Rotaviruses, using analysis of viral RNA. J.Am. Vet. Med. Ass., 173: 531-537
- Mendoza A., Vega M.A. y Morilla A. 1986. Uso de vinagre y jugo de limón en la prevención de las diarreas en los lechones XXI Reunión Anual AMVEC. Puebla. Pue. pp-186
- Miles, A.A., and Misra, S.S. 1938. The estimation of the bacteriocidal power of the blood. J. of Hygiene Cambridge 38: 732-743
- Mitchell, I. de G. and Kenworthy R. 1976. Investigations on a metabolite from Lactobacillus bulgaricus which neutralizes the effect of enterotoxin from Escherichia coli pathogenic for pigs. J. Appl. Bacteriol. 41: 163-174
- Moon, H.W., Sorenson, D.K., and Sautter, J. 1966. Escherichia coli infection of the ligated intestinal loop of the newborn pig. Am. J. Vet. Res. 27: 1317-1325

Moon, H.W. and Whipp L. 1971. Systems for testing the enteropathogenicity of Escherichia coli Ann. N.Y. Acad. 176: 197-214.

Morilla A. 1983. Mecanismos de resistencia de lechón. Porcira. 8: 58-64

Morilla A. 1985. El síndrome diarreico de los lechones. Porcira. 9: 16-25

Morotomi, M., Watanabe T., Suegara, N., Kawai, Y. and Mutai, M. 1975. Distribution of indigenous bacteria in the digestive tract of conventional and gnotobiotic rats. Infect. Immun. 11: 962-967

Muralidhara, K.S., Sandine., W.E., Elliker. P.R., and England, D.C. 1972. Effect of feeding lactobacillus concentrates on coliform excretion and scouring in swine. J. Dairy Sci. 55: 661.

Muralidhara, K.S., Sandine, W.E., England, D.C., and Elliker, P.R. 1973. Colonization of E. coli and lactobacillus in intestine of pigs. J. Dairy Sci. 56: 365

Muralidhara, K.S., Shoggeby G.C., Elliker, P.R. England D.C., and Sandine. W.E. 1977. Effect of feeding lactobacilli on the coliform and lactobacillus flora of intestinal tissue and feces from piglets J. food protection. 40:288-295.

Ocampo, L.C. y Sumano L.H. 1985. Fisiología de la diarrea. Avances en enfermedades del cerdo. 1:323-326.

Olson, T. 1961. Intestinal disorders in pigs: prophylaxis and therapy with lactobacillus acidophilus. Svensk Veterinartidning. 18: 353.

Parker, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health* 29: 4-8

Plotkin, B., and Bemis, D. 1980. Evidence for two mechanisms of adherence in Bordetella bronchioseptica. Abstr. Annu. Mtg. Am. Soc. Microbiol. 1980: 26

Pollman, D.S., Danielson, D.M. and Peo, E.R. 1980. Effects of microbial feed additives on performance as starter and growing finishing pigs. *J. of Animal Sci.* 51: 577-581

Puchal, F.M. 1984. Estado actual de los acidificantes en nutrición porcina. 9: 31-50

Ramírez, N.R.. 1974. Limitantes para el inicio de una campaña de erradicación del colera porcino en el país. III Reunión Anual de Sanidad Animal. México, D.F., pp-98-100

Reddy, G.V. and Shahani, K.M. 1971. Isolation of an antibiotic form Lactobacillus bulgaricus. *J. of Dairy Sci.* 54: 748

Redmond, H.E. and Moore, R.W., 1965. Biologic effect of introducing Lactobacillus acidophilus into a large swine here experiencing enteritis. *Southwestern Vet.* 18: 297

Reeves, P. 1965. The bacteriocins. *Bact. Rev.* 29: 24-42

Rettger, L.F. and Cheplin H.A. 1921. A treatise on the transformation of the intestinal flora with special reference to the emplantation of *Bacillus acidophilus*. New Haven, Connecticut: Yale University Press.

Rogosa, M. Mitchell, J.A. and Wiseman, P.P., 1951. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *J. of Bacteriol.* 62: 132-133

Romero, P.M.I. y Ambriz, C.F.A., 1987. Utilización de vinagre a diferentes concentraciones para disminuir la diarrea de los cerdos lactantes. Tesis de Licenciatura, Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli. Edo. de México.

Rosales O.C. Estrada, C.A. Morilla A., Campos N.E. Ruiz-Navarrete. M.A. y Aceves A. 1983. Efecto del yogurt y un preparado de bacterias acidificantes sobre las diarreas de los lechones. *Tec. Pec. Méx.* 45: 80-85

Rubin, H.E. and Vaughan F. 1979. Elucidation of the inhibitory factors of yogurt against Salmonella typhimphium. *J. Dairy. Sci.* 62: 1873.

Ruiz, M.A. Velázquez, T.A., Arriaga, D.C., Villar, C., y Morilla, G.A., 1985. Rotavirus y pararotavirus asociados a diarreas en México. Reunión de investigación pecuaria de México. pp-83

Rutter, J.M. 1975. Escherichia coli Infections in piglets: Pathogenesis virulence and vaccination. *Vet. Rec.* 96: 171-175.

Sally, A.R. 1985. A note on yeast growth in media used for the cultivation of lactobacilli. *J. of Appl. Bacteriol.* 59: 153-156.

Sandine, W.E. 1979. Role of lactobacillus on the intestinal tract. *J. food, prot.* 42: 259.

Savage, D.C. 1975. Indigenous microorganisms associating with mucosal epithelia in the gastrointestinal ecosystem. pp-120-123. In microbiology- 1975. S. Schlessinger, ed. Am. Soc - Microbiol. Washington. D.C.

Savage, D.C. 1978. Factors involved in colonization of the gut epithelial surface. Am. J. Clin. Nutr. 31: 5131

Sharman, G.A.M. Jones, A.S., Denerley, B. and Elseley, F.W. H. 1971. A pig herd established by hysterectomy Res. Vet. Sci. 12: 65-73

Sharpe, M.E. 1981. The genus *Lactobacillus*. In the prokaryotes ed. Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G. Balows, A. y Shlegel, H.G. pp-1653-1679. Berlin: Springer-Verlag

Slomiany, B.L. and Slomiany, A. 1984. Lipids of mucus secretions of the alimentary tract. In attachment of organisms to the gut mucosa. Vol. 2 ed. Buedeker, E.C. p.-23.31 Boca Raton: CRC Press.

Smith, H.W., and Balls, S. 1967. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. J. pathol bacteriol. 93: 499-529

Smith, H.W. and Huggins, M.B. 1963. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs, J. of gen. Microbiol. 29: 2659-2675.

Smith, H.W., and Jones, J.E.T. 1963. Observations on the alimentary tract and its bacterial flora in healthy and diseased pigs. J. pathol bacteriol. 86:387-417.

Smith H.W., Witty R. and Brown P. 1968. Effect of poly-L-arginine on rate of bovine IgG transport by newborn pig intestine. Nature, 220: 387-388

Speck, M.L. 1980. Preparation of lactobacilli for dietary uses J. food prot. 42:65

Stamer, J.R., 1979. The lactic acid bacteria: microbes of diversity, Food technology: 31: 60-65

Suegara, N. Morotomi, M. Watanabe, T., Kawai, Y., and Mutai M. 1975. Behavior of microflora in the rat stomach: Adhesion of lactobacilli to the keratinized epithelial cells of the rat stomach in vitro. Infection and immunity, 12: 173-179

Tagg, J.R., Dajani, A.D., and Wannamaker L.W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40:722-756.

Takeuchi, A., and Savage, D. 1973. Adherence of lactobacilli and yeast to murine gastric epithelium. Paper presented at annual meeting of the Am. Soc. Microbiol. Miami, F.L., pp-6-11

Tortuero, F. 1973. Influence of the implantation of lactobacillus acidophilus on chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. Poultry. Sci. 52: 197

Tramer, J. 1968. Inhibitory effect of lactobacillus acidophilus nature, 211: 204-205.

Trujano, C.M. y Méndez M.D., 1981. Causas de mortalidad de lechones en dos granjas de Tepuaji del Río. XVII. Asoc. MEX. de Especialistas en Cerdos.

Underdahl, N.R., Torres-Medina, A. and Douster, A.R. 1982. Effect of Streptococcus faecium C-68 in control of Escherichia coli induced diarrhea. J. 22: 227-232

Upreti, G.C., and Hinsdill, R.G. 1975. Isolation and characterization of a bacteriocin from a nonfermentative lactobacillus. Antonie van Leeuwenhoek. 41: 487-494

Upreti, G.C. and Hinsdill R.G. 1975. Production and mode of action of lactobacin 27: bacteriocin from a nonfermentative lactobacillus. J. 41: 139-145

Bruchartu, B. y Doperto, J.M., 1975. Mortalidad de lechones. Estudio recapitulativo. Vet. MEX. 6: 96-106

Bruchartu, A., Méndez, D. Doperto, J.M., Romoza, R.H., López J. y Sánchez F. 1976. Un estudio sobre la mortalidad de lechones en México. Vet. MEX. 7: 111-123

Vega, M.A. Buíz, A. Martínez, A.G., Rize, J., López, J., Cuaron, J. y Morilla, A. 1986. Estimulación de la absorción de proteínas del calostro en los lechones por tratamiento con suero homólogo oral. Rev. Rec. MEX. 50: 25-25

Vincent, J.G., Veomett, R.C., and Riley, R.P. 1955. Relation of the indigenous flora of the small intestine of the rat the postirradiation bacteremia. J. Bacteriol 69: 38-44.

Vincent, J.G., and Riley, R.F. 1959. Anti-bacterial activity associated with Lactobacillus acidophilus. J. of bacteriol. 78: 477-484.

Wadström, T., Andersson, K., Bydew, M. Axelsson K., Lindgren, R. y Gullmar, B. 1987. Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. J. of appl. bacteriol. 62: 513-520

Wilson, G.S. and Miles, A.A. (ed). 1964. Tepley and Wilson's principles of bacteriology and Immunity 5th. ed. London: Edward Arnold

Winkelstein, A., 1956. L. acidophilus tablets in the therapy of functional intestinal disorders. Am. Practitioner, 1: 1637

Ziolecka, A., Osinka, A. and Zioleckii, A. 1984. The effect of estabilized rumen extract on growth and development of calves. I. liveweight gain and efficiency of food utilization. Zeitschrift tierphysiologie, tierernährung und futtermittrikunde 51: 13-20

