

5129



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACCION DE
Lactobacillus spp. Y ACIDIFICANTES VEGETALES
FRENTA AL Escherichia coli ENTEROTOXIGENICO”

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

YOLANDA ARACELI TREJO HERRERA

Director de Tesis: M. en C, CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

1990



V N A M



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

	Página
RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	3
1.1. Flora intestinal	3
1.2. Bacterias benéficas en el tracto intestinal	3
1.3. Bacterias productoras de ácido láctico	8
1.4. Especificidad de especie y adhesión bacteriana	9
1.5. Mecanismos posibles de acción de los <u>Lactobacillus</u>	14
1.5.1. Adhesión-Competencia	14
1.5.2. Disminución del pH	14
1.5.3. Bacteriocinas	15
1.6. Probióticos	16
1.6.1. Definición	16
1.6.2. Probióticos frecuentes	16
1.6.3. Usos y beneficios	18
1.6.4. Características de un buen Probiótico	24
1.7. Acidificantes vegetales	25
1.7.1. Generalidades	25
1.7.2. Mecanismo de acción	27
1.7.3. Usos	31
2. OBJETIVOS	34
JUSTIFICACION	35
3. MATERIALES Y METODOS	40
3.1. Origen de las muestras	40
3.2. Pruebas efectuadas	40

3.2.1. Formación de halos de inhibición en agar Rogosa de los <u>Lactobacillus</u> frente a <u>E. coli</u>	41
3.2.2. Inhibición del crecimiento de <u>E. coli</u> in vitro usando <u>Lactobacillus</u> en medio sin befferar	41
3.2.3. Inhibición del crecimiento de <u>E. coli</u> in vitro usando acidificantes vegetales en medio bufferado	42
3.2.4. Inhibición de la actividad enterotoxigénica de <u>E. coli</u> por <u>Lactobacillus</u>	43
3.2.5. Inhibición del crecimiento de <u>E. coli</u> por vinagre de alcohol de caña al 50% in vivo	44
3.2.6. Inhibición del crecimiento de <u>E. coli</u> por <u>Lactobacillus fermentum</u> usando sobrenadante con pase	45
3.2.7. Inhibición del crecimiento de <u>E. coli</u> por <u>Lactobacillus fermentum</u> usando cultivo total con pase	46
3.3. Lesiones histopatológicas en el intestino delgado de gazapos usando acidificantes vegetales y biológicos	46
4. RESULTADOS	47
5. DISCUSION	75
6. CONCLUSIONES	82
7. APENDICE	83
8. BIBLIOGARFIA	85

R E S U M E N.

Se ha observado que cepas de Lactobacillus ejercen acción antagonica contra gérmenes como E. coli, para lo cual se proponen - posibles mecanismos de acción como son:

Adhesión-Competencia

Disminución del pH y,

Producción de bacteriocinas.

De igual forma se controla y previenen microorganismos patógenos con el uso de ácidos orgánicos, los cuáles ayudan a reducir el pH intestinal.

Para estudiar el comportamiento de los Lactobacillus y --- acidificantes vegetales frente a E. coli enterotoxigénico se trabajaron:

Cepas de origen diarreico, no diarreico y comercial; in vivo e in vitro. Usando medio sin bufferar, sobrenadante y cultivo total - con pase.

Los acidificantes vegetales empleados para observar su ---- comportamiento in vitro fueron: vinagre de alcohol de caña, vinagre de manzana y ácido acético en medio bufferado. In vivo para determinar la inhibición del crecimiento de E. coli se uso alcohol de caña al 50%.

También se estudiaron las lesiones histopatológicas en el --- intestino delgado de gazapos usando ambos acidificantes.

Se encontró que las cepas de Lactobacillus trabajadas son - efectivas para inhibir el crecimiento de E. coli in vitro, obtenien-- dose un máximo de sobrevivencia de 29.76% y un mínimo de 0.01%.

Muy eficiente resultó el uso de sobrenadante y cultivo total con pase in vivo, ya que el porcentaje de sobrevivencia fué de 0.24% y 2.07% respectivamente.

El ácido acético inhibió notablemente el crecimiento de E. coli in vitro. In vivo se observó que con la administración oral de acidificantes vegetales a gazapos se reducía el crecimiento de E. coli en forma muy notoria, debido a su pH tan bajo (pH = 3.4).

Pero el estudio histopatológico detectó que los vinagres producen mayor grado de lesión en el epitelio intestinal. A diferencia de los Lactobacillus cuyos efectos fueron casi insignificantes.

1.1. Flora intestinal.

El intestino contiene un complejo sistema ecológico de organismos aerobios y anaerobios, un gran número de ellos viven en simbiosis con el hospedero jugando un importante papel en el funcionamiento del aparato digestivo, como es en el caso de algunos que intervienen en la síntesis de ciertos nutrientes esenciales, así como en la elaboración de la vitamina B y ácido fólico (C. Beck and H. Necheles, 1980). P.G. Sarra and F. Dellaglio, 1984); se podría decir que esto beneficia la salud general. En los animales recién nacidos las condiciones de pH en esta edad pueden favorecer el desarrollo de bacterias nocivas para el animal por lo que es muy importante suministrar microorganismos benéficos que ayuden a prevenir el crecimiento de los patógenos y además estimular el establecimiento de la propia flora del animal (Collier & Hardy, 1986).

1.2. Bacterias benéficas en el tracto intestinal.

Desde principios del presente siglo se ha reportado que la microflora del intestino puede influir en el promedio de vida e interferir con la salud del hospedero (citado por J.L. Buenrostro and F.H. Kratzer, 1983). Metchnikoff (1907), sugiere que los Lactobacillus son importantes para la formación de una población microbiana balanceada en el tracto intestinal de aves y mamíferos (Fuller, R. 1977). A menudo se ha implicado que un mejoramiento en la salud resulta con la ingestión de Lactobacillus (citado por Fuller, R. 1976).

Este género se subdivide en dos grupos (Brown, 1977):

- Homofermentativos.

- Heterofermentativos.

- Lactobacillus homofermentativos: el ácido láctico es el producto principal, obtenido a partir de la glucosa (85% ó más).
- Lactobacillus heterofermentativos: son menos activos que los anteriores, utilizan hidratos de carbono para degradarlos y producir la fermentación de: aproximadamente el 50% de ácido láctico bajo la forma D., L ó DL., y cantidades importantes de ácido acético y etanol (R. Welter et N. Henry, 1982).

La mayor parte de la flora intestinal, aproximadamente 90% esta representada parcialmente por anaerobios homofermentativos ó exclusivamente por anaerobios heterofermentativos como la bacteria ácido láctica (Lactobacillus ó Bifidobacterium), además anaerobios productores de ácido butírico y de otros ácidos volátiles, como los Bacteroides, Fusobacterium y Eubacterium. El 1% de la flora total consiste de Enterococcus y Escherichia coli. Un 0.01% esta constituido por Clostridium, Staphylococcus, Blastomyces, Pseudomonas, Proteus

La flora del intestino delgado de mamíferos esta formada por Lactobacillus, Streptococcus, Staphylococcus, Enterococcus y Levaduras; y la flora del colon por Bacteroides, Fusiformes, Lactobacillus anaerobios y coliformes. Y más específicamente la flora del estómago del cerdo está formada por Lactobacillus, Streptococcus, Bacteroides. La del ileo por Bacteroides, Streptococcus, Eubacterium, E.coli. Y la del colon por Bacteroides, E.coli, Eubacterium, Clostridium, Pepstostreptococcus, Ruminococcus, Levaduras, Proteus, Selenomonas y Veilonella sp. (Tannock and Smith, 1970; Gilliland S.E. et al., 1978; Fuller et al., 1978; Russell,

E.G., 1979; Robinson et al., 1984; Brigitte, G.M. 1987; Varel et al., 1987). El principal papel de esta microflora es ayudar a la digestión de alimentos y la exclusión de patógenos. En el tracto digestivo existen interacciones importantes entre los microorganismos extraños y propios de la flora del hospedero, estos microorganismos compiten por nutrientes y producen un gran número de metabolitos, incluyendo acetato, lactato, propionato, ácidos volátiles, vitaminas, enzimas, sustancias antibacteriales y un gran número de compuestos químicos. Estas interacciones incluyen competencia, mutualismo, comensalismo, predación (J.F. Wu., 1986 Brigitte, G.M. 1987).

Dentro de los microorganismos presentes en el intestino merece especial atención la bacteria ácido láctica, la cual pertenece al género Lactobacillus y ha sido ampliamente estudiada desde 1900 (citado por Sarra, P.G., 1984). Cepas de Lactobacillus acidophilus han sido aisladas del tracto intestinal de humanos (Gilliland, S.E. et al., 1975) y se ha demostrado ampliamente que ellos representan gran parte de la microflora de humanos sanos (P.G. Sarra and F. Dellaglio, 1984), también los Lactobacillus son considerados flora normal en el estómago de ratón, rata y cerdos, los cuales colonizan la superficie del epitelio escamoso queratinizado del estómago de estos animales (Tannock et al., 1970), así como el epitelio escamoso no queratinizado del buche de aves (Fuller & Brooker, 1974). El balance de la microflora intestinal se ve afectada por la composición de las dietas consumidas, y el aumento ó disminución de ciertos microorganismos consecuentemente es causa de un buen ó mal aprovechamiento de ciertos nutrientes por el hospedero (J.L. Buenrostro and H.H. Kratzer, 1983). La colonización bacteriana en el intestino se ve aumentada por una alimentación rica en glucidos fermenta-

bles obteniéndose una proliferación más importante de Lactobacillus con acción antagonica contra germenef nefastos como E.coli (citado por J.L. Buenrostro, 1983). En 1977, se demostró que los Lactobacillus --- crecen mejor a pH ácido menor de 4-5; lo que puede ayudar a controlar y detener el crecimiento del patógeno E.coli. Se usaron pollos gnotobióticos a los que se les administró E.coli, Lactobacillus y cloruro de polivinil para estudiar la competencia entre E.coli y Lactobacillus in vivo, observando que hubo menor crecimiento de E.coli en el buche e intestino delgado a diferencia de los pollos a los que se les administró E.coli unicamente (Fuller, R. 1977).

Muralidhara et al., (1977), intentaron aislar Lactobacillus de heces de lechones que tenían 4 horas de nacidos y observaron que su flora esta formada principalmente de diferentes bacterias anaerobias fermentativas y el número se ve modificado a lo largo del tracto digestivo, encontrando que en las heces los Lactobacillus representan un 2.4% de la flora total (citado por R. Wolter et N. Henry, 1982). H.J. Barnes (1987), reportó que en los cerdos jóvenes E.coli es detectado en las heces 2 horas después del nacimiento y los Lactobacillus se detectan hasta 18 horas después. Muralidhara et al., 1977; Sandine, W.E., 1979, reportaron que L. acidophilus y L. reuteri los cuáles habitan el tracto intestinal de humanos y animales controlan y estabilizan la microflora intestinal normal.

Dentro del aparato digestivo existe una relación muy compleja entre el buen uso de nutrientes y el pH. Esta relación también existe entre pH y las bacterias no patógenas como Lactobacillus, cuyo desarrollo se favorece a pH entre 4-5 y las bacterias patógenas, como algunas variedades de Escherichia coli que tienen multiplicación mayor a un pH de 6-7

Esto se ve en animales como el lechón, el cual al nacimiento es extremadamente sensible a infecciones, ya que no posee suficientes medios de defensa antes de la primera ingestión del calostro (Bolh, E.H., 1979, - Morilla, 1983). Además de que los valores de pH son relativamente elevados 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 la que el pH gástrico alcanza - cifras inferiores a 2 (Puchal, 1984). A bajo pH se observa que las condiciones de producción de ácido láctico inhibe la capacidad reproductiva de muchos anaerobios facultativos, incluyendo coliformes, lo que provee beneficios al mantener el balance de la flora entérica normal (I.M. Robinson et al., 1984).

Los animales sanos se caracterizan generalmente por tener un buen --- funcionamiento del tracto intestinal. Este hecho es fundamental en la -- eficiente conversión de alimento en crecimiento ó producción. Una característica más importante del buen funcionamiento del tracto intestinal es el balance de su microflora bacteriana. Un tracto intestinal saludable tiene una preponderancia de poseer bacterias ácido láctico, tales como Lactobacillus y Streptococcus. Este equilibrio en el tracto --- intestinal es alterado cada vez que el animal esta bajo stress. En este momento, el balance favorece al patógeno E.coli. En ambos casos la --- proporción de E.coli a Lactobacillus la que es crucial. El promedio específico de crecimiento rápido de E.coli siempre le permitirá ser -- dominante, por lo tanto a más stress más E.coli. De aquí que las poblaciones de Lactobacillus y Streptococcus debe de estar mantenida a -- niveles altos (T.P. Lyons, 1987).

1.3. Bacterias productoras de ácido láctico.

Lactobacillus acidophilus.

Lactobacillus bifidus.

Lactobacillus brevis.

Lactobacillus bulgaris.

Lactobacillus casei.

Lactobacillus cellobiosus.

Lactobacillus collinoides.

Lactobacillus fermentum.

Lactobacillus lactis.

Lactobacillus plantarum.

Lactobacillus ruminis.

Lactobacillus vitulinus.

Leuconostoc cremoris.

Leuconostoc dextranicum.

Leuconostoc lactis.

Pediococcus acidolactici.

Pediococcus halophilus.

Pediococcus pentosaceus.

Pediococcus cremoris.

Pediococcus diacetilactis.

Streptococcus diacetilactis.

Streptococcus faecium.

Streptococcus lactis.

(J. F. Wu., 1986).

El grupo de bacterias productoras de ácido láctico más importantes - son los Lactobacillus. Estos son microorganismos anaerobios facultativos y utilizan diversos carbohidratos (glucosa, ribosa, fructosa, xilosa galactosa) como fuente de energía. Además de tener gran habilidad para crecer rápidamente y resistir las condiciones del tracto digestivo ---- (Shahani and Ayebo., 1980).

Morfológicamente son bastones delgados y largos; curvos ó rectos; ---- otros son parecidos al cocobacilo, usualmente se encuentran solos ó en - cadenas.

Son gram positivos, pero a medida que transcurre el tiempo se vuelven más ácidos y se convierten en gram negativos; son catalasa negativos y no forman esporas.

1.4. Especificidad de especie y Adhesión bacteriana.

En estudios in vitro sobre los Lactobacillus se ha observado que estas bacterias exhiben cierta especificidad, así como difieren en su habilidad para colonizar el epitelio escamoso (G.W. Tannock et al., 1982)

Suegara et al., (1975), usaron un sistema in vitro para observar la adherencia de cepas de Lactobacillus y observaron que cepas aisladas de ratas sólo pueden adherirse a las células queratinizadas del estómago de ratas, ninguna de estas cepas se adhirió a las células del buche de pollo. Similarmente algunos Lactobacillus aislados de pollos, se adherieron a las células del buche de pollo, pero no a las células queratinizadas del estómago de ratas.

El Lactobacillus aislado de humanos y cerdos no se adhirió a las -

celulas de pollo ni de rata (citado por E. Wesley and G.W. Tannock, --- 1979). El fenómeno de especificidad se ha confirmado por inoculación de roedores libres de gérmenes, pollos y cerdos con cepas de Lactobacillus. Las cepas de Lactobacillus pueden colonizar el epitelio del estómago de roedores, pero no el epitelio del buche ó del estómago de pollos. Los Lactobacillus no adaptados al huésped están sujetos a --- competitividad con otros tipos microbianos, pudiendo ser eliminados del sistema convencional.

A excepción de otras especies de Lactobacillus L. reuteri si puede adaptarse habilmente y colonizar el lumen del tracto digestivo de roedores, posiblemente multiplicandose a lo largo del contenido intestinal --- resultando la presencia de un gran número de Lactobacillus en el animal huésped (G.W. Tannock and R.D. Archibald, 1984).

Los Lactobacillus se adhieren y colonizan también el epitelio escamoso del tracto digestivo de ratones, ratas, pollos y cerdos convencio--- nales (citado por G.W. Tannock and R.D. Archibald, 1984). Algún grado de adhesión es necesario para la colonización microbiana de la superficie epitelial para que continuamente sea nivelada por el contenido del estó--- mago e intestino. Por ejemplo, la superficie del buche del pollo es cu--- bierta casi por completo por una capa de Lactobacillus que atacan las células epiteliales escamosas (Fuller, R. 1973, Fuller et al., 1978; --- Fuller et al., 1980), y el ataque de Streptococcus faecium a células epiteliales del intestino delgado de pollos también ha sido demostrado (Fuller et al., 1981). E.W. Wesley and G.W. Tannock, 1979); Lactobaci--- llus aislados del estómago de ratón se agrupan en "biotipos" los que se basan en su habilidad para fermentar la N-acetil glucosamina, dextri--- na y celobiosa. S. D.C. Roach et al., 1977, reporta que tipos represen---

tativos de estos dos biotipos son (el grupo A y C), los que colonizan el epitelio escamoso queratinizado del estómago de ratones gnotobióticos.

Los Lactobacillus del grupo A parecen ser el biotipo dominante en el estómago del ratón, ratas, aves y cerdos. E. Wesley and G.W. Tannock 1979; señalan que en cada huésped animal predominan 1 ó 2 biotipos. Por ejemplo, el grupo E y F predomina en el estómago de ratas. La presencia de un gran número de Lactobacillus es debido a la habilidad de ciertos biotipos para atacar la pared del buche (A.M. Markine, 1982).

La inoculación de animales recién nacidos con cepas de Lactobacillus que colonizan el epitelio escamoso pueden proveer más eficiencia - desde el punto de vista de establecer una microflora benéfica en el tracto gastrointestinal, que el añadir continuamente preparaciones bacterianas a los alimentos de estos animales con cepas que no colonizan -- como es el caso de L. bulgaricus (G.W. Tannock et al., 1982). Later, - Rahe, demostraron que L. acidophilus difiere de L. bulgaricus principalmente por el factor natural de habitat en el intestino humano.

L. bulgaricus varía mucho, probablemente la razón de esto es su --- prolongado cultivo en leche, lo que no le permite sobrevivir largo ----- tiempo en el tracto gastrointestinal (H. Necheles et al., 1980). Las cepas de L. bulgaricus en el yoghurt natural, normalmente no se encuen-- tran en humanos, es por esto que numerosos intentos para colonizar el -- intestino delgado con esta bacteria no ha tenido buenos resultados. Las cepas de Lactobacillus que no pueden colonizar el epitelio son menos probables para que se establezcan en el tracto gastrointestinal a causa del fenómeno de interferencia microbiana (citado por Tannock et al., 1982)

Se ha demostrado in vitro que los Lactobacillus de cerdos se divi--

den en cepas adhesivas y no adhesivas. Pero es importante tener información sobre el funcionamiento de las cepas adhesivas in vivo, para tener un mejor efecto sobre la salud y habilidad para prevenir diarreas en animales jóvenes (A.M. Markine, 1982). R. Fuller, (1986) reportó, que los microorganismos que se establecen en el estómago y tienen la capacidad de unirse al epitelio crecen rápidamente. Así como cepas de Lactobacillus de cerdos seleccionadas en base a su capacidad de adhesión y a su buen crecimiento in vitro presentan una reducción significativa en el conteo de coliformes en el estómago y duodeno.

Las cepas de Lactobacillus difieren en su habilidad para adherirse colonizar y multiplicarse en el epitelio escamoso. Los determinantes involucrados en esta adhesión son carbohidratos como se muestra por su susceptibilidad con peryodato de sodio y su unión a Concalavalina-A.

Al teñirse una sección delgada de Lactobacillus con rojo de rutenio y ponerla en contacto con el epitelio, se observó que el carbohidrato está organizado en forma de capa fuera de la pared, y tiene filamentos delgados extendidos hacia la superficie del epitelio. Los filamentos no son esenciales para la adhesión porque los microorganismos en fase estacionaria no los poseen y aún así se unen. Estos sólo pueden reforzar la unión primaria (B.E. Brocker and Fuller, R., 1975). Fuller & Brocker (1980), demostraron que los Lactobacillus poseen fimbrias vellosas superficiales y microcapsulares llamadas glicocalix superficial bacteri- al, localizada en la superficie mucosal. Estas determinantes son responsables de la colonización del epitelio del buche de pollos, así como de las interacciones con el epitelio escamoso de la parte esofágica de cerdos jóvenes. Marcando finas secciones con un conjugado de Con-A-peroxidasa se ha confirmado la existencia de sitios de unión a la Con-A en

la superficie de los Lactobacillus (B.E. Brooker and R. Fuller, 1975).

La especificidad de Con-A hacia porciones de glucosa, manosa, fructosa y arabinosa con la configuración alfa-anomérica, indican la existencia de uno ó más sitios en la superficie de estos Lactobacillus e implica su importancia en la adhesión.

Parece probable que un primer sitio de adhesión bacteriana es el punto donde la separación de la bacteria y la membrana de la célula es mínima (R. Fuller and B.E. Brooker, 1974). Sarra et al., 1985 han sugerido que el determinante genético involucrado en la adherencia está localizado en un plásmido.

1.5. Mecanismos posibles de acción de los Lactobacillus.

1.5.1. Adhesión-Competencia.

La bacteria ácido láctico interviene en la reducción de aminas tóxicas y amoníaco, adhesión a la pared intestinal previniendo la colonización por patógenos (Fuller & Brooker, 1974). Se reporta que los Lactobacillus proliferan más rápidamente en el tracto gastrointestinal cuando hay gran cantidad de glucidos fermentables, así como también intervienen en mantener una autoregulación de la población bacteriana (citado por R. Welter et. N. Henry, 1982).

1.5.2. Disminución del pH.

La bacteria ácido láctico excreta metabolitos con acción contra bacterias patógenas como son: producción de ácidos orgánicos, tales como ácido láctico y ácido acético (Marriot and Davidson, 1924). Estos ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno y el lactato producido por la bacteria ácido láctica disminuyen el pH intestinal, lo que impide que los microorganismos patógenos sobrevivan y se multipliquen (Tramer, 1966; Gilliland and Speck, 1977). Con la producción de ácido láctico y ácido acético por los Lactobacillus se inhibe el crecimiento de numerosas bacterias gram negativas, disminuyendo el potencial de óxido reducción y

umentando el peristáltismo (citado por R. Welter et. N. Henry, 1982).

Los ácidos orgánicos producidos por Lactobacillus provocan que el pH disminuya y de esta manera se produzca un efecto bacteriostático contra muchos microorganismos como E. coli, además de ayudar a estimular el metabolismo normal (M. Mosse, 1987).

1.5.3. Bacteriocinas.

Algunas especies de Lactobacillus producen sustancias antimicrobiales (Wheater et al., 1951; Vincent et al., 1959; Sabine, 1963). ó metabolitos que neutralizan la enterotoxina de E. coli (I. de G. Mitchell and Kenworthy, 1976). Muralidhara (1974), aisló la 2-deoxi-D-glucosa de filtrados de cultivo de Lactobacillus lactis y Hamden and Mikolajcic (1974), encontraron en el filtrado de L. acidophilus un componente acidificado con una estructura cíclica y de un peso molecular de 198 Daltons, el cuál inhibió varios microorganismos incluyendo E. coli.

Muchas de las bacterias ácido láctico poseen la habilidad de producir bacteriocinas, las cuáles son compuestos parecidos a los antibióticos que ayudan a establecer un buen balance de la flora intestinal (Tagg et al., 1976). Entre los antibióticos naturales producidos por estas bacterias están: la nisina (Streptococcus lactis); el bulgarican (Lactobacillus bulgaricus); la acidolina, acidofilina, lactobacilina y lactocidina (L. acidophilus (Grosswies et coll., 1974). Shahani et al, (1976,1977), estudiaron la acción de la acidofilina y bulgarican contra una gran variedad de organismos gram negativos patógenos.

La acidofilina fué aislada usando una mezcla de metanol acetona para su extracción y posteriormente cromatografía en sílica gel ó Sephadex. Shahani et al., 1977 observaron in vitro la actividad antibacterial de

este antibiótico. Aproximadamente 30-60 ~~µg~~ (0.2-0.4 unidades) de ácido--
filina por ml. de solución acuosa, causa el 50% de inhibición de micro--
organismos como E.coli. Los Lactobacillus tienen efecto inhibitorio
y antagónico sobre el crecimiento de microorganismos patógenos como; ---
E.coli, Neisseria gonorrhoeae, Pseudomona sp. Staphylococcus au-
reus, Salmonella sp., Bacillus sp., Shigella sp. y Vibrio sp. --
(Tortuero, 1973; Stern and Storrs, 1975; Shanan et al., 1977; Morin et al
1980).

1.6. Probiótico.

1.6.1. Definición.

Probiótico se origina de dos palabras griegas que significan -----
"pro-vida" y contrasta con el término antibiótico que significa "contra-
la vida" (R. Welter et N. Henry, 1982; T.P. Lyons, 1987). Un probiótico
es un producto que contiene enzimas, microorganismos vivos específicos
por ejemplo: Lactobacillus, Streptococcus y Levaduras, así como --
sus metabolitos (proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos y vitaminas) -
el cual incorporado a través del alimento proporciona flora y elementos-
nutritivos que optimizan y potencializan al máximo las fermentaciones --
digestivas, manteniendo la flora fisiológica normal del tracto digestivo
de los animales y humanos (T.P. Lyons, 1987).

1.6.2. Probióticos frecuentes.

El término "Probiótico" fué usado por primera vez en 1974, por Parker
para describir organismos y sustancias que controlan el balance de la -
microflora intestinal, también abarca cultivos microbiales, metabolitos

microbiales, preparaciones comerciales, complementos alimenticios y yoghurt. Dentro de las preparaciones comerciales usadas como complemento alimenticio para animales se encuentran:

Probiótico 1 - tabletas y/o gránulos cuya concentración de Lactobacillus acidophilus es de 10^7 y 10^9 células/ml y de Lactobacillus bulgaricus 10^8 células/ml.

Probiótico 2 - (Paquete probiótico microencapsulado).

Composición: Lactobacillus acidophilus, Streptococcus faecium y Lactobacillus bifidus (2×10^{10} células/gramo).

Enzimas: amilasas, proteasas, celulaasa, β -Glucanasas.

Vitaminas: A, D, E y complejo B.

Probiótico 3 - (Bacterias microencapsuladas con enzimas).

Composición:	células/gramo.
<u>Streptococcus faecium.</u>	10 Billones.
<u>Lactobacillus plantarum.</u>	10 Billones.
<u>Lactobacillus acidophilus.</u>	1 Billón.

	unidades/gramo.
celulasas	15 Millones
amilasas	30 Millones
proteasas	8 Millones
β -glucanasas	4 Millones

Probiótico 4 - (Complemento de electrolitos, modificado con enzimas y fortificado con Lactobacillus).

Composición: Lactobacillus acidophilus

Streptococcus faecium

Dextrosa

Electrolitos (sodio y potasio).

amilasas

celulasas

proteasas

Estas preparaciones bacterianas se elaboran a base de bacterias lácticas en forma viva (Johnson, D.E. and F.M. Calia, 1979; T.P. Lyons, 1987)

1.6.3. Usos y Beneficios.

Por mucho tiempo se han usado ciertas bacterias para el tratamiento de diarreas y otros desórdenes intestinales. El primer sistema usado fue el de la administración oral de bacilos productores de ácido láctico en leche capaces de subsistir en el intestino, Metchnikoff (1908). Dentro de los Probióticos están los Lactobacillus como se mencionó antes y de los cuáles se han estudiado sus efectos benéficos.

Los Lactobacillus son capaces de producir específicamente varios efectos en el animal huésped.

- (1): Inhibición del crecimiento de patógenos intestinales.
- (2): Provee enzimas como la beta-galactosidasa para la hidrólisis de la lactosa.
- (3): Asimilación de colesterol.
- (4): Promotores del crecimiento.

(S.E. Gilliland, 1977; Ducluzeau et coll., 1987; Shahani and B.A. Friend 1983);

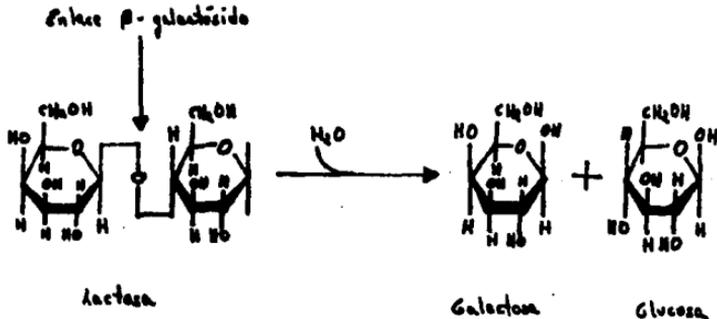
-(1)- Inhibición del crecimiento de patógenos intestinales. El tratamiento de desórdenes intestinales con yoghurt u otros productos que tienen Lactobacillus se han usado para bajar el pH del intestino y de esta forma inhibir ó controlar los patógenos entéricos (R. Fuller, 1975) Sheck, (1976), el añadir Lactobacillus acidophilus al alimento y agua de beber causa cambios favorables en la microflora intestinal. Muchas declaraciones han sido hechas acerca de la eficiencia del yoghurt en la prevención de enfermedades gastrointestinales, estas han sido apoyadas por evidencias de la actividad inhibitoria in vitro contra E.coli (citados por E.I. Garvie, et al., 1984). Experimentos in vivo e in vitro indican como los Lactobacillus inhiben las reacciones de la enterotoxina inducida por E.coli, produciendo sustancias directamente antagónicas a las enterotoxinas e impide su colonización en el intestino (citado por Watkins and B.F. Miller, 1982). Esto es importante ya que los Lactobacillus se pueden usar en la terapia contra E.coli enterotoxigénico. En los lechones, la alimentación con yoghurt tiene un marcado y consistente efecto reductor sobre las cuentas de E.coli en el estómago y duodeno. Lactinex, un preparado comercial (compuesto de L. bulgaricus y L. acidophilus) tienen un efecto muy significativo en la reducción de fluidos inducidos por E.coli enterotoxigénico en el lumen intestinal. Los Lactobacillus (en leche) permanecen viables en el yeyuno de 4-6 horas, inhibiendo la actividad enterotoxigénica de E.coli en el intestino delgado (citado por E.I. Garvie, 1984). I. de G Mitchell and Kenworthy 1976, han detectado en el sobrenadante de culti-

vos de L. bulgaricus una sustancia con actividad antienterotoxigénica y con acción benéfica dando como resultado una disminución de diarreas y un aumento en el peso al ser añadidos a dietas de cerdos recién destetados Gilliland, (1979) reportó, que alimentando a humanos con leche fermentada conteniendo células de L. acidophilus causa un significativo incremento en el número de Lactobacillus en las heces. Elliger et al., (1978), observaron disminución en el número de bacterias coliformes en las heces de ruminantes cuando también consumieron leche fermentada. Similarmemente Muralidhara et al., (1977) reportaron que el incluir L. acidophilus en la dieta de cerdos jóvenes provoca una disminución en el número de E. coli en el tracto digestivo. Muchos investigadores han estudiado los potenciales benéficos de los Lactobacillus como es la prueba del efecto inhibitorio in vitro para microorganismos entéricos (citado por Watkins & Miller, 1982), ó in vivo por el crecimiento competitivo con E. coli en pollos gnotobióticos (Fuller, R. 1977; Watkins et al., 1982). Así como la reducción en el número de E. coli presente en el íleo de pollos de 5 a 7 días de edad. Se intenta usar preparaciones de Lactobacillus acidophilus viables para mantener en equilibrio la flora intestinal en el caso de problemas de diarrea, ya que se ha reportado que en ocasiones el uso de antibióticos produce efectos nocivos contra la flora. Esto se puede administrar en leche fermentada, yoghurt, mantequilla de leche, leche ácida ó en forma de gránulos ó cápsulas elaboradas a base de un cultivo de Lactobacillus viables y estable.

Pequeñas dosis de tales preparaciones pueden significativamente disminuir la población de coliformes en ratas bebés (citado por E.I. Garvie et al., 1984)

-(2)- Provee enzimas como la beta-galactosidasa para la hidrólisis de la lactosa:

Estudios de la actividad proteolítica y lipolítica de varios cultivos lácteos (Poznanski et al., 1965; Chandan et al., 1969) demuestran la gran importancia que tienen los Lactobacillus, Streptococcus y Leuconostoc en la prehidrólisis de las proteínas de la leche. Hargrove & Alford (1978) reportaron, que en ratas alimentadas con yoghurt se incrementa la eficiencia en la utilización del alimento. La lactosa de la leche en algunas ocasiones, causa problemas nutricionales en personas deficientes de la enzima intestinal lactasa ó beta-galactosidasa. Por lo que es sugerible que personas intolerables a la lactosa consuman yoghurt ya que ésta es hidrolizada por la lactasa producida por los organismos lácticos, como se muestra a continuación.



Kilara & Shahani (1976) mostraron, que los niveles de lactasa se incrementan durante la incubación de los cultivos de yoghurt (citado por K.M. Shahani and B.A. Friend, 1983). En los lechones, la actividad amilolítica de ciertas sustancias producidas por los Lactobacillus vienen

a preparar la acción de las amilasas endógenas, esta acción sinérgica es necesaria para una máxima hidrólisis del almidón en los lechones gnotobióticos. (Szyllit et coll., 1980). Szyllit et Charlet (1981), y para la retención proteica. Se ha observado también que Lactobacillus sp. -- produce amilasa que ayuda a la digestión del alimento.

-(3)- Asimilación de Colesterol.

K.M. Shahani and B.A. Friend, 1983 reportan, que la hipercolesteremia se considera como uno de los mayores factores predisponentes de la arteriosclerosis. Se ha demostrado que suplementando la dieta con cultivos lácteos, disminuye notablemente los niveles de colesterol en suero.

Hepner et al., (1979) reportan, un efecto hipocolesterémico en sujetos humanos que recibieron una dieta suplementada con yoghurt. Investigaciones recientes (Sinha, 1978) demostraron que adicionando al alimento leche que contiene células de L. acidophilus viables, reduce significativamente en ratas los niveles de colesterol en suero. Este efecto ---- también ha sido mostrado midiendo los niveles de colesterol en suero --- usando a cerdos como animales de prueba (Nakamura and Crowell, 1979); -- Lindgren and Refai, 1984; Gilliland et al., 1985).

-(4)- Promotores del crecimiento.

Aunque se ha observado mejoría en la salud y promedio de crecimiento por dietas que contienen bacterias ácido láctico en animales, no se ha -- logrado su uso universal en la alimentación de cerdos, como se hace con los antibióticos y otros promotores de crecimiento. Al ir conociéndose -- el modo de acción de los Lactobacillus, su uso se ha incrementado es-- pecialmente en la crianza de estos animales (citado por I. de G. Mitchell

and R. Kenworthy; 1976); en los problemas de diarrea asociadas a -----
E.coli.

Los Lactobacillus actúan como promotores del crecimiento por inte--
racción con microorganismos de la flora de animales ó por alteración ---
directa de las actividades de enzimas involucradas en la absorción de --
nutrientes en los enterocitos del hospedero. La fosfatasa alcalina y la
fosfodiesterasa están expuestas en el lumen del intestino delgado y a la
flora asociada al epitelio queratinizado del estómago, reflejando efec--
tos directos en el metabolismo del huésped. Las fosfatasas alcalinas ---
juegan un papel importante en la función del transporte activo en las --
microvellosidades, absorción de colesterol y otros lípidos y de monosa--
cáridos (citado por D.P. Volton et al., 1971).

Una dieta con yoghurt mantiene superioridad nutricional, comparada --
con otras dietas suplementadas con vitaminas. Varios organismos lácticos
son capaces de biosintetizar vitaminas, lo que depende de la temperatura
y un periodo de incubación largo (Nilson et al., 1965). El yoghurt con--
tiene de 4.0-5.1 μ g de biotina/100 g de yoghurt; 0.35-0.52 μ g de B /100
gr. de yoghurt; 3.9 μ g de ácido fólico/100 g de yoghurt; 130-141 μ g de -
niacina/100 gr. de yoghurt; 280-381 μ g ácido pantoténico/100 g de -----
yoghurt. (citado por K.M. Shahani and B.A. Friend; 1983).

Ciertos gérmenes como Lactobacillus plantarum excretan lisina libre
la cuál es capaz de compensar alguna carencia alimenticia (Moore et al.,
1982). L. fermentum añadido a una dieta deficiente de lisina, provee -
ganancia y eficacia en la utilización del alimento, promoviendo el cre--
cimiento en cerdos, en un promedio de 5.9, 7.9 y 14% respectivamente en
un periodo de 3 semanas (K.M. Shahani and B.A. Friend, 1983; G.W. -----
Tannock, 1984).

1.6.4. Características de un buen Probiótico.

- a) No patógeno para animales y humanos.
- b) Gram positivo: Las bacterias gram positivas como los lactobacillus son más resistentes a la destrucción por enzimas digestivas como la liposima.
- c) La bacteria debe ser resistente a condiciones ácidas al pasar por el estómago e intestino delgado. Además de ser productor rápido de ácido -- con acción antagonica contra coliformes sensibles a condiciones ácidas.
- d) Cepa específica: Para que la bacteria sea efectiva es importante que colonice, es decir que sea específica de especie y se adhiera a lo largo del tracto intestinal y no solamente se quede en el lumen.
- e) Tolerante a la bilis (C.N. Jones and Thomas, 1980).
- f) La bacteria debe ser activada rápidamente y tener un alto promedio de crecimiento (T.P. Lyons, 1987).

Los factores que afectan el potencial de los Probióticos para colonizar el intestino son:

- i) La falta de adherencia al epitelio intestinal, lo cual puede impedir el crecimiento de organismos para colonizar.
- ii) Falta de habilidad para crecer en el medio ambiente intestinal donde la colonización exitosa depende de utilizar substratos disponibles y --- agentes resistentes antibacterianos presentes en el medio ambiente.

La infectividad de la bacteria en los Probióticos también depende de su resistencia al ácido clorhídrico y a los ácidos biliares. Esta ----- también establecido que la acidez gástrica es una importante barrera en la colonización del intestino. Es esencial por lo tanto que la bacteria en el Probiótico tenga la habilidad para sobrevivir condiciones ácidas

en el estómago (T.P. Lyons, 1987).

1.7. Acidificantes Vegetales.

1.7.1. Generalidades.

Se ha demostrado que en animales recién nacidos el aparato digestivo no se encuentra funcionando a su totalidad. Manners (1976), sugiere que esta inmadurez esta asociada con una producción deficiente de ácido clorhídrico en el estómago, la cual provoca una inadecuada reactivación del pepsinógeno a pepsina disminuyendo sensiblemente la capacidad de digestión de proteínas a nivel estomacal. Asimismo existe un pobre estimulación de las secreciones pancreáticas. S.G. Cornelius, St. P. Minn, 1988. La pepsina es secretada en forma inactiva como zymogeno (pepsinógeno), la conversión de este zymogeno a su forma activa (pepsina) es catalizada por la acción del ácido presente en el estómago. Y los productos de la acción de la pepsina son pequeños péptidos. Esta actividad proteolítica inicial es necesaria para la subsecuente actividad de la tripsina en el intestino delgado; también se ven estimuladas la secreción de enzimas proteolíticas. Permitiéndose la proliferación de ciertas bacterias nocivas, esto debido a un elevado pH en el estómago. En cierta forma esto explica la susceptibilidad de los lechones a desordenes gastrointestinales. Etheridge et al., (1984), reportan que en los iniciadores convencionales constituidos por maíz y soya se digiere el 59% en comparación a un 79% en dietas con leche ó sustitutos de leche (debido posiblemente a la presencia de remanentes de soya no digerida). Esta disminución de la digestibilidad provoca diarreas y la presencia de material no digerido en el duodeno favorecerá posteriormente el desarrollo

de bacterias patógenas y por lo tanto la manifestación de diarreas infecciosas. Para disminuir estas diarreas de tipo mecánico ó infeccioso se utilizan generalmente antibióticos, sin embargo es muy probable que debido a residuos de material no digerido en el duodeno favorecerá posteriormente el desarrollo de bacterias patógenas y por lo tanto la manifestación de diarreas infecciosas. Para disminuir estas diarreas de tipo mecánico ó infeccioso se utilizan generalmente antibióticos, sin embargo es muy probable que debido a residuos de material no digerido (por ejemplo el almidón, los cuales son fuente de nutrientes para todo tipo de microorganismos) al eliminar el tratamiento con antibióticos se reestablezca la flora nociva, lo que sugiere que el problema puede ser amortiguado al alimentar con dietas adicionadas con ácidos orgánicos (Kirschgessner and Roth, 1982; Falkowski and Aherne, 1984; Edmonds et al 1985; Giesting and Easter., 1985).

En los cerdos jóvenes la acidificación del contenido estomacal es mediado por el ácido clorhídrico y ácido láctico. La producción de ácido clorhídrico es baja y va aumentando gradualmente conforme avanza la edad observándose una relación directa entre la presencia de ácido láctico y la capacidad de producción de ácido clorhídrico en el estómago (Crowell et al., 1976). Kvasnitskii (1951), citado por Kidder and Manners (1978) fundamentó que en los cerdos una adecuada acidificación del estómago ocurre hasta los 2.5 meses de edad. (Annon, 1985), es importante conocer el desarrollo del sistema digestivo durante el pre y pos-destete para tener en cuenta la producción de enzimas y el pH en las diferentes partes del tracto intestinal. Al administrar una buena dieta es posible estimular ó incrementar la producción de enzimas y la acidez en el contenido estomacal induciéndose cambios en la producción de la acidez gástrica.

trica normal, la que se ve muy limitada durante los primeros días de vida del animal. Reduciéndose el pH gástrico se limita el crecimiento bacterial.

G.L. & T.W. Burnell; (1987), generalmente los cerdos son destetados a las 3-4 semanas de edad, donde su sistema digestivo es relativamente inmaduro y no digieren los carbohidratos y proteínas en los granos de cereal, ni harina de soya. Por lo que puede resultar eficiente la lactosa, la caseína y la lactoalbúmina presentes en la leche e incluidos en la dieta iniciadora de cerdos recién destetados para favorecer el descenso del pH intestinal. Con este fin se han usado acidificantes orgánicos como es el: ácido acético, cítrico, propiónico, fumárico. Scipioni et al., (1978), mostraron que el valor de pH del estómago de cerdos de 42 días se reduce de 4.5 o 4.2 a 3.5 con la suplementación en el alimento de --- (0.7%) de ácido fumárico y (1.0%) de ácido cítrico respectivamente.

También observaron que al alimentar a lechones con dietas adicionadas con ácidos orgánicos, hubo una disminución significativa en el número de coliformes y bacterias anaerobias en el tracto intestinal.

Además con la reducción del valor de pH se promueve la actividad peptídica mejorando la digestión (Manners, 1976).

Posiblemente con la adición de ácidos orgánicos a la dieta se completa la producción de ácido láctico, reduciendo el pH y de esta forma prevenga el crecimiento de microorganismos patógenos, así como ayuda a mejorar la utilización de nutrientes (R.J. Fallon, 1985).

1.7.2. Mecanismos de acción.

Manners (1970), reportó que la acidificación de las dietas de cerdos se relaciona con la activación del pepsinógeno producido por la mucosa gástrica. Ya que la producción de ácido clorhídrico en lechones jóvenes no es suficiente para causar esta activación. En 1976, sugirió que la fragmentación de los peptidos no ocurre en el estómago de cerdos jóvenes, esto trae como consecuencia que las proteínas del forraje pasen por el intestino delgado casi intactas. El paso rápido y los bajos niveles de proteasas en el intestino de cerdos recién destetados, limitan la digestión de estas complejas proteínas en dicho forraje. Kovacs et al., (1972), reportaron que con un pH bajo en el tracto intestinal se favorece la proliferación de Lactobacillus y se reduce el crecimiento de --- otros microorganismos susceptibles a pH ácido. El disminuir el pH es --- importante para obtener la acción proteolítica de la enzima pepsina en el estómago; la cuál tiene un pH óptimo entre 2.0 y 3.5 (Kidder and Manners, 1978). Otra posible acción de los acidificantes incluye su efecto antimicrobial reportado por Vogt et al., (1981). Se han reportado re----ducciones en el conteo de Escherichia coli en el duodeno y yeyuno de cerdos a los que se les alimentó con dietas acidificadas. Y se observó - que con la adición de ácido cítrico se tiene un efecto curativo en vacas con diarrea (Cowie., 1964); Falkowski & Aherne, 1984. La adición de ácidos orgánicos influye en el balance mineral y en el metabolismo intermedio. También se obtienen beneficios con la administración de intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico como son el ácido cítrico ó fumarico, como se observa en la figura I. Los ácidos orgánicos al presentar posiblemente acción antimicrobial por disminución del pH gástrico, destruyen bacterias potencialmente perjudiciales. Both et al., (1981), reportaron la reducción de conteos microbiales en pollos jóvenes alimen-

tados con varios niveles de ácidos orgánicos (citado por Bliesting & Easter, 1985).

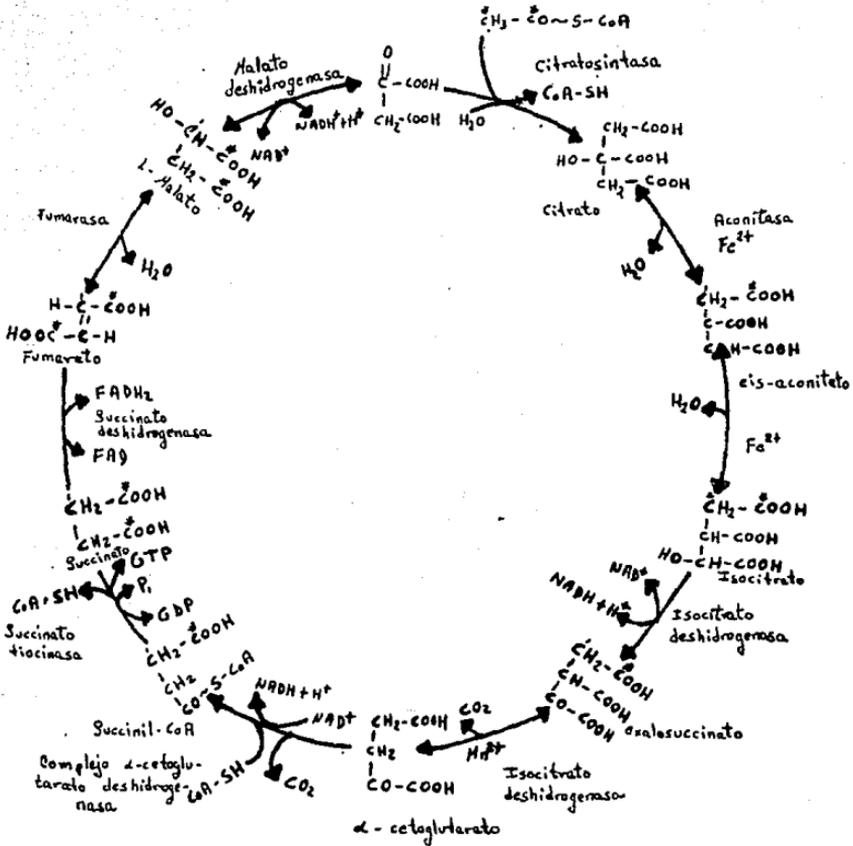


FIG. 1. CICLO DE KREBS.

Puchal, 1984, menciona que una de las principales causas de diarrea en el lechón es la presencia de E.coli que necesita de un pH entre 5-6 para adherirse a la pared intestinal. Esto sugiere que el mecanismo de acción del vinagre administrado por vía oral sea porque disminuye el pH del estómago y duodeno, evitando así que se adhiera E.coli disminuyendo con esto la diarrea en los lechones. La acción de las enzimas digestivas está limitada en los animales jóvenes y se alcanza el pH óptimo para su funcionamiento, al adicionar acidificantes a la dieta, con lo que se logra que la actividad de las enzimas sea más efectivo.

Existen microorganismos en el tracto gastrointestinal que compiten por nutrientes y son causantes de diarrea y otros desórdenes digestivos, por lo que al administrar vinagre a la dieta se puede bajar el pH del estómago, lo que estimula el crecimiento de bacterias acidificantes benéficas e inhibe el de coliformes patógenas. Los ácidos orgánicos pueden actuar como agentes quelantes resultando en un incremento y balance en la absorción de minerales en el intestino. Se consigue el pH óptimo de funcionamiento para la actividad enzimática, ya que disminuyendo el pH de las dietas se puede bajar el pH gástrico, con lo cual se incrementa la conversión de pepsinógeno a pepsina, la cual es una importante enzima proteolítica que tiene actividad máxima a pH bajo. Por lo que a pH ácido se puede permitir por más tiempo la digestión de proteínas en el estómago (G.L. Cromwell & T.W. Burnell, 1987).

1.7.3. Usos

En investigaciones recientes se han reportado los beneficios del uso de acidificantes, los cuales son principalmente disminución en la incidencia de diarreas y de mortalidad, así como el incremento en ganancia de peso. Actualmente, la mayor parte de la leche, sustitutos de esta, alimento concentrado preiniciador e iniciador, y el agua de algunas especies animales se acidifica en diversos países del mundo, para reducir las diarreas y problemas digestivos (G.L. Cromwell & T.W. Burnell, 1987) Kershaw et al., (1966) reportaron que con la adición de ácido láctico en la dieta se mejoró el crecimiento y la eficiencia en la utilización del alimento. Muchos trabajos muestran los efectos de acidificar continuamente el alimento sobre la microflora intestinal. Vuyst et al., (1972 1973), fundamentaron que con la adición de ácidos orgánicos (10-20 g/kg) a dietas de becerros se modificó significativamente la ganancia en peso, mejorando el crecimiento y eficacia en la alimentación (Packett and Butcher, 1983). Estos mismos autores en 1963 reportaron que con la adición de (20g/kg) de ácido cítrico a dietas de corderos provocó un significativo mejoramiento en el crecimiento y sobre la eficiencia del alimento.

La inclusión de ácido cítrico (30 g/kg) en la dieta de lechones de 10 días de edad promueve significativamente la ganancia en peso, y con la adición de ácido fumárico (15 g/kg) no se observó este efecto (Henry, -- Pickard and Hughes, 1985). Con la inclusión de ácidos orgánicos en las dietas de cerdos recién destetados se observa una mejora en el crecimiento (Falkowski and Aherne, 1974; Kirchesner and Roth, 1976).

Young and coll., (1970), encontraron que alimentando a cerdos con ma-

iz tratado con ácido propiónico crecen más rápido que los que son ali---
mentados con maíz seco. Bayley y coll. (1974), reportaron un incremento
en energía por la utilización de proteína en un estudio utilizando cer---
dos alimentados con maíz conservado con propionato. Kirchgessner and ---
Roth, 1980 sugieren que los ácidos orgánicos pueden actuar aumentando la
digestibilidad, si son adicionadas a las dietas simples para que los ---
cerdos alcancen su óptima utilización (citado por D.W. Giesting and R.A.
Easter, 1985). En (1982) revisaron el uso de ácido fumárico como aditivo
en el alimento de cerdos, el cuál promueve significativamente el creci---
miento y ganancia en peso de 10 a 7% respectivamente. También fundamen---
taron que se mejora la digestibilidad de las proteínas y se aprovecha me---
jor la energía en 2.3%, la retención de nitrógeno en un 5.7% y el balan---
ce de calcio y fosforo en un 14 y 13% respectivamente. Aunque otros ----
autores (Falkowski and Aherne, 1984; Henry et al., 1985; Edmonds et al.,
1985; Giesting and Easter, 1985; G.L. Cromwell & T.W. Burnell, 1987), en---
cuentran que es variable. La inclusión de ácido cítrico en las dietas
previas al destete de cerdos ayuda a incrementar la ganancia en peso, y
la eficiencia en la utilización del alimento (R.J. Fallon, 1986). El ---
mismo autor en 1985, reportó que el adicionar ácidos orgánicos a la die---
ta de vacas, lechones, becerros, terneros y pollos se observaron efectos
producidos sobre la alimentación, conversión de alimento, digestibilidad
y disminución de desórdenes digestivos. Estudios recientes usando -----
acid-Pack (Alltech/Apligen), compuesto por L.acidophilus, Streptoco-
ccus faecium, Sacharomyces cerevisiae, amilasas, proteasas, celula---
sas, ácido cítrico, ácido sórbico, citrato de sodio, benzoato de sodio,
propionato de calcio, extracto seco de la fermentación de Aspergillus
niger, y de Bacillus subtilis, incorporado a las dietas a base de

maíz-soya (Burnell et al., 1986), demuestran un mejoramiento en las ganancias de peso y de la eficiencia en la conversión de un 10%, en lechones destetados.

Existe una importante influencia de los ácidos orgánicos en la palatabilidad de la ración. La mayoría de los estudios resaltan que la adición de dichos ácidos en la dieta tiende a reducir el consumo del alimento (Henry et al., 1985; Falkowski and Aherne, 1984). Giesting and Easter (1985), compararon la inclusión de varios ácidos orgánicos a dietas a base de maíz-soya a lechones destetados, durante 28 días, reportando que sobre todo el ácido propiónico tuvo efecto depresor del consumo voluntario.

El uso de agentes acidificantes (cítrico, fumárico, fosfórico) actúan sinérgicamente con los Probióticos para mantener una flora saludable.

Muchos experimentos muestran que la adición de ácidos orgánicos a las dietas iniciadoras de cerdos ayuda al funcionamiento por influencia de la microflora del intestino, mejorando la actividad de las enzimas digestivas y la utilización del alimento (V.Rusell, 1979).

2.0. OBJETIVOS.

- 1) Evaluar la inhibición del crecimiento de E.coli enterotoxigénico por la acción de Lactobacillus y vinagre in vivo e in vitro.
- 2) Determinar las condiciones de cultivo óptimas para que una cepa de Lactobacillus tenga un buen efecto cuando se desee usar in vivo.
- 3) Determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento de E.coli y grado de lesión histopatológico en gazapos inóculados con E.coli y a los que posteriormente se les administró Lactobacillus ó vinagre.

El porque de este trabajo es debido a la importancia que actualmente tienen las diarreas en la producción veterinaria, ya que siguen siendo un problema en las granjas porcícolas por lo que se buscan mecanismos ó alternativos de control diferentes a los antibióticos. Dentro de estas alternativas se encuentran los Probióticos administrados a los lechones durante las primeras semanas de nacidos.

Dentro de los Probióticos estan las Lactobacillus y sus metaboli--
tos.

Se pueden usar acidificantes orgánicos como: el ácido cítrico, fumá--
rico, acético, propiónico, etc. y de esta forma limitar el crecimiento de bacterias patógenas como Escherichia coli. Por lo que el propósito de este trabajo es el de ilustrar como la acidificación y las bacterias lácticas pueden utilizarse para mejorar la salud animal y su producti--
vidad en forma natural.

Así como también debido a la naturaleza indcua y benéfica de los ----
Lactobacillus estos podrian ser administrados principalmente a niños con problemas diarreicos de tipo bacteriano.

PLAN DE TRABAJO EXPERIMENTAL

ACIDIFICANTES BIOLÓGICOS.

MATERIAL BIOLÓGICO.

- 1 CEPA DE LACTOBACILLUS DE ORIGEN DIARREICO
- 2 CEPAS DE LACTOBACILLUS DE ORIGEN NO DIARREICO
- 2 CEPAS DE LACTOBACILLUS DE ORIGEN COMERCIAL

ACTIVIDAD ANTI - E. COLI ENTEROTOXIGENICA POR LACTOBACILLUS

IN VIVO

INHIBICION DE LA ACTIDAD ENTEROTOXIGENICA POR -- Lactobacillus EN ASA LI-GADA DE CONEJO.

INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE E.coli POR Lactobacillus fermentum EN GAZAPOS USANDO CULTIVO TOTAL CON - PASE.

INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE E.coli POR Lactobacillus fermentum EN GAZAPOS, USANDO SO BRENADANTE CON PASE.

ESTUDIO HISTOPATOLOGIVO DE LOS INTESTINOS DE GAZAPOS.

IN VITRO

FORMACION DE HALOS DE INHIBICION DE LOS Lac tobacillus FRENTE A - E.coli.

INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE E. coli USANDO Lactobacillus- EN MEDIO SIN -- BUFFERAR CON -- PASE Y SIN PASE.

2. DIAGRAMA DE FLUJO

INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE E. coli POR ACIDIFICANTES BIOLÓGICOS
IN VITRO.

6 ML. DE CALDO SOYA TRIPTICASEINA SIN BUFFERAR

+

4 ML. DE CULTIVO TOTAL O SOBRENADANTE DE Lactobacillus
CON O SIN PASE

+

0.1 ML. DE E. coli ESTANDARIZADO (*)

↓
INCUBAR 4 HRS. A 37 C

↓
SEMBRAR EN AGAR McCONKEY

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

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

3. DIAGRAMA DE FLUJO.

ACIDIFICANTES VEGETALES.

VINAGRE DE ALCOHOL DE CAÑA
VINAGRE DE MANZANA
ACIDO ACETICO DILUIDO AL 5%
ACIDO ACETICO DILUIDO 1:1000

INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE E.coli ENTEROTOXIGENICO.

IN VIVO

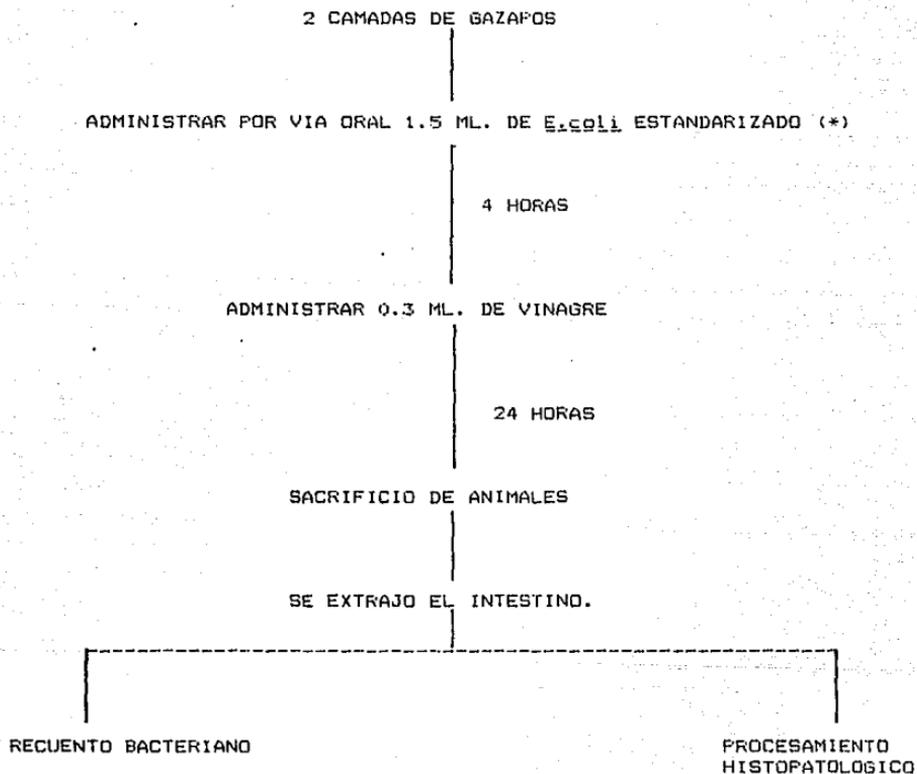
IN VITRO

INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE
E.coli POR VINAGRE DE ALCOHOL
DE CAÑA AL 50% (DIAGRAMA 3a.)

INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE
E.coli USANDO ACIDIFICANTES
VEGETALES EN MEDIO BUFFERADO.

3a. DIAGRAMA DE FLUJO.

INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE E.coli POR VINAGRE IN VIVO.



(*) 550 NM Y 0.1 ABSORBANCIA.

3.0. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Origen de las muestras.

Se trabajaron cepas de Lactobacillus suministradas por el Laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, cuyo comportamiento in vitro ya había sido previamente evaluado en medio bufferado. Estas -- cepas fueron las siguientes:

Origen Diarreico:

4c Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum

Origen no Diarreico:

61 Lactobacillus fermentum

68 Lactobacillus fermentum

Origen Comercial:

9 Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum

SN Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum

1

3.2. PRUEBAS EFECTUADAS.

3.2.1. Formación de halos de inhibición en agar Rogosa de los Lactobacillus frente a E. coli.

Muchos investigadores han estudiado los potenciales benéficos de los Lactobacillus, como es la prueba del efecto inhibitorio in vitro para microorganismos entéricos (citado por Watkins & Miller, 1982).

Procedimiento: En cajas de agar rogosa se sembró Escherichia coli de cuatro horas de crecido, estandarizado a 550 nm y 0.1 de absorbancia se agregó 1 gota de cada una de las cepas de Lactobacillus en su correspondiente condición (cultivo total con o sin pase, sobrenadante con y sin pase) en dos de los extremos de la caja. Se dejó que secaran las gotas y se incubó a 37 C durante 24 horas. Posteriormente se midieron los halos de inhibición.

3.2.2. Inhibición del crecimiento de E. coli in vitro usando Lactobacillus en medio sin bufferar.

Para observar la inhibición del crecimiento de E. coli in vitro en presencia de Lactobacillus se usó 6 ml. de caldo soya tripticasefina (TSB) sin bufferar. Se adicionó 4 ml. de la cepa de Lactobacillus en las condiciones a probar (cultivo total con o sin pase, sobrenadante con o sin pase); entendiendo por pase un cultivo que se incubó por 72 horas se agregó otros 6 ml. de caldo rogosa y se dejó incubar 72 horas más. Y sin pase un cultivo de 72 horas en 6 ml. de caldo rogosa; más 0.1 ml de un cultivo de E. coli de 24 horas de crecido, estandarizado a 550 nm y 0.1 absorbancia. Posteriormente se incubó la mezcla 4 horas a 37 C.

Se procedió a hacer recuento de bacterias por profundidad. Se hicier-

ron 8 diluciones en tubos de ensaye, los cuáles contenían 4.5. ml. de solución salina fisiológica al 0.85% . Y se procedió a sembrar las 5 -- últimas diluciones por duplicado; se puso 1 ml. de cada dilución en las cajas de Petri estériles e identificadas. Se agregó 15 ml. de agar ---- McConkey, se agitó la caja 30 veces. Se dejó solidificar, se incubó a 37 C por 24 horas y se hizo el recuento bacteriano. Se midió el pH a -- las cero, cuatro y veinticuatro horas. Esto también se hizo usando la -- mezcla de las 5 cepas en condiciones de cultivo total con pase, sobrenadante con pase y las condiciones óptimas en las cuáles funcionó mejor cada cepa.

3.2.3. Inhibición del crecimiento de E. coli in vitro usando acidificantes vegetales en medio bufferado.

En la inhibición del crecimiento de E. coli in vitro en presencia - de acidificantes vegetales, se usó caldo soya tripticaseína bufferado - (TSB). Para bufferar el medio se adicionó 5 ml. de caldo soya triptica- seína a 1 ml. de la mezcla de KH₂PO₄ al 4% (fosfato de potasio monobási- co) + NaH₂PO₄ al 3% (fosfato de sodio dibásico anhidro). Se hicieron 4 - diluciones dobles en agua destilada estéril de los acidificantes corres- pondientes (vinagre de manzana al 5%, vinagre de alcohol de caña al 5% y ácido acético glacial. De cada dilución se agregaron 4 ml. a los tu-- tubos que contenían 6 ml. de TSB bufferado, previamente identificados.

Esto se hizo por duplicado para medir el pH. Posteriormente se agre- gó 0.1 ml. de E. coli de 24 horas de crecido diluido 1:100 y estandariz- zado a 550 nm y 0.1 absorbancia. Se incubaron durante 4 horas a 37 C y se hizo recuento de bacterias por profundidad, poniendo 1 ml. de la co-

respondiente dilución + 15 ml. de agar McConkey, se agitó 30 veces, se dejó solidificar, se incubó 24 horas a 37 C. y se hizo el recuento en el cuenta colonias. Se midió el pH a las cero, cuatro y veinticuatro horas.

3.2.4. Inhibición de la actividad enterotoxigénica de E. coli por Lactobacillus.

Se llevó a cabo en asas ligadas de intestino delgado de conejo de 2 meses de edad. Las 5 cepas a probar se trabajaron en las siguientes condiciones: cultivo total con pase, cultivo total sin pase, sobrenadante con y sin pase; de las cuáles ya se tenían datos de su eficacia en la inhibición de E. coli enterotoxigénico in vitro, usando medio bufferado. Se cultivaron en 6 ml. de caldo rogosa a 37 C durante 24 horas, inoculando luego una mezcla de 0.5 ml. de E. coli estandarizado a 550 nm y 0.1 de absorbancia + 2 ml. de Lactobacillus en diferente condición de cultivo en cada asa.

Procedimiento: Fué llevado a cabo mientras los animales estaban anestesiados mediante inhalación con éter, se mantuvieron 24 horas en ayuno antes de la operación. El abdomen fué abierto mediante una incisión de 8 cm. a lo largo de la línea alba y 5 cm. abajo del diafragma, procediendo luego a localizar el intestino delgado teniendo la precaución de descartar los primeros 45 cm. de intestino. Las ligaduras se efectuaron de 8-10 cm. dejando siempre 2 espacios de 4 cm. cada uno entre los segmentos donde se inoculaban las cepas, con el fin de evitar el paso de líquido de un segmento a otro en el caso de ser positiva.

Se inocularon 5 cepas por conejo, además de la cepa control positiva (2.5 ml de caldo TSB con E. coli estandarizado en las condiciones an--

teriores) y la negativa (2.5 ml de caldo soya tripticaseína). El proceso total se efectuó lo más rápido posible, después los animales eran mantenidos en jaulas privados de alimento y aún de agua durante las 18 horas postoperatorias, al final de las cuales eran sacrificados mediante la inhalación de una dosis excesiva de éter. El abdomen fue abierto -- inmediatamente, removiendo luego el intestino delgado y anotando la -- presencia de líquido en las asas, así como el volumen acumulado, considerando como positiva la reacción cuando las asas acumulaban 2 veces o más la dosis que se inoculó.

3.2.5. Inhibición del crecimiento de E. coli por vinagre de alcohol de caña al 50% in vivo.

A dos camadas de 10 gazapos cada una, de 3 días de nacidos se les -- administró por vía oral con ayuda de una cánula 1.5 ml de E. coli de -- 24 horas de crecido, estandarizado a 550 nm y 0.1 de absorbancia. Se -- esperó 4 horas y posteriormente se administró 0.3 ml. de vinagre de alcohol de caña al 50%. La dosis de vinagre se sacó en base a la administrada al lechón, la cual es de 5 ml. para 1500 g (Morrilla, 1983).

Tomando en cuenta el peso promedio del gazapo que es de 80 g. Se -- esperó 24 horas sin quitárselos a la coneja. Y posteriormente se sacrificaron con éter o descerebrandolos. Se extrajo el intestino y se cortaron 2 fragmentos, uno para hacer recuento bacteriano, el cual se puso en una caja de Petri estéril, se adicionó solución salina fisiológica -- estéril, se maceró y se hicieron 5 diluciones en 4.5 ml. de S.S.F. Se -- sembraron en agar McConkey por profundidad. Poniendo 1 ml. de cada dilución + 15 ml. de agar McConkey, se hizo por duplicado. Otra fracción

se lavó con solución Serensen Fosfato Buffer frío, usando para ello una jeringa de tuberculina y una aguja de calibre 27 x 13 (1/2") para ---- limpiar bien el intestino de restos fecales y conservándolo con una --- solución de Formaldehído al 10% en PBS para su posterior proceso histopatológico. A dos gazapos de cada camada se les administró solamente -- 1.5 ml. de E.coli (Control +), para confirmar por medio de recuento de bacterias el grado de colonización en el intestino delgado. Y al otro gazapo se le administró agua destilada estéril para poder observar que el intestino de estos animales a los 2-3 días de nacidos esta libre de E.coli.

3.2.6. Inhibición del crecimiento de E.coli por Lactobacillus fermentum usando sobrenadante con pase.

Se usaron 2 camadas de 10 gazapos cada una, de 3 días de edad. Se les administró por vía oral con ayuda de una cánula 1.5 ml de E.coli ---- estandarizado a 550 nm y 0.1 de absorbancia. Se esperó 4 horas y posteriormente se les administró 0.6 ml de sobrenadante con pase de la cepa de Lactobacillus. Para obtener el sobrenadante se centrifugo a 1,500 rpm durante 15 minutos. La dosis fue de 0.6 ml. Después de 24 horas se sacrificaron. Se hicieron 5 diluciones y recuento por profundidad. Una fracción del intestino se lavó y se puso en solución de Formaldehído al 10% en PBS. También se dejaron 2 gazapos como controles positivos, a -- los que se les administró 1.5 ml de E.coli estandarizado. Y un gazapo de cada camada a los cuáles se les administró agua destilada estéril.

3.2.7. Inhibición del crecimiento de E.coli por Lactobacillus ----
fermentum usando cultivo total con pase.

Se trabajó de la misma forma que en el punto anterior. Administrando
0.6 ml de cultivo total con pase.

3.3. Se estudiaron las lesiones histopatológicas en el intestino del--
gado de gazapos usando acidificantes vegetales y biológicos.

4 . RESULTADOS.

3.2.1. Se encontró que las 5 cepas trabajadas son efectivas para inhibir el crecimiento de E. coli in vitro (Tabla 1).

3.2.2. Se observó in vitro que con el uso de cultivo total de las diferentes cepas de Lactobacillus se redujó el crecimiento de E. coli enterotoxigénico, obteniéndose un máximo de sobrevivencia de 29.76% y un mínimo de 0.01% (Tabla y Figura 2).

Al usar el sobrenadante de las cepas de Lactobacillus, se redujó marcadamente el crecimiento de E. coli enterotoxigénico, el máximo de sobrevivencia fue de 19.21% y el mínimo de 0.003% (Tabla 3 y Figura 2).

En la Figura y Tabla 4 se observa que la mezcla de Lactobacillus inhibe el crecimiento de E. coli, pero no tan eficiente como las cepas trabajadas individualmente. Se obtuvo un mínimo de sobrevivencia de 1.75% y un máximo de 8.69%, pero comparado este valor con el 100% se ve que si se reduce notablemente.

Sólo se observó variación de pH con tendencia a disminuir en las cepas porcinas de origen no diarreaico. En las de origen diarreaico y comercial se obtuvo un valor de pH máximo de 5.3 y como mínimo de 5 (Figura y Tabla 5).

En la cepa 61 con sobrenadante y con pase se observó aumento de pH a las 0 horas, siendo como máximo de 6.0 y mínimo de 5.6 (Figura y --

Tabla 6).

3.2.3. En la Figura y Tabla 7 se encontró que con el uso de acidificantes vegetales la máxima dilución de todos ellos que inhiben en 100% el crecimiento de E. coli es 1:4. Sin embargo, todos los acidificantes pueden diluirse aún hasta 1:16 y obtener un porcentaje de inhibición aceptable.

No se observó variación significativa del valor de pH a diferentes tiempos usando medio bufferado (Figura y Tabla 8).

3.2.4. Se observó que el comportamiento de los Lactobacillus in vivo fue más constante y eficiente con las cepas de origen porcino. La inhibición de E. coli fue más efectiva 100% con el uso de cultivo total. Aunque con el sobrenadante el porcentaje de inhibición también es bueno (Figura y Tabla 9).

La inhibición de E. coli tuvo mejor efecto con el uso de cultivo total y con el sobrenadante las cepas de origen no diarreico son las que mejor presentaron este efecto (Figura 9 y Tabla 10).

3.2.5. Como se muestra en la Tabla 11 y 12 el porcentaje de inhibición de crecimiento de E. coli encontrado con el uso de vinagre fue muy alto.

3.2.6. El porcentaje de inhibición de crecimiento de E. coli fue muy

alto, siendo mayor con el uso de sobrenadante con pase, el cuál es -- casi de 100% (Tabla 13, 14 y 15).

3.3. En el estudio histopatológico se encontró que los vinagres producen mayor grado de lesión que los Lactobacillus a nivel del epitelio intestinal.

TABLA 1

HALOS DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE E. coli POR CEPAS
DE Lactobacillus.

CEPA DE <u>Lactobacillus</u>	# DE PASES	HALO DE INHIBICION	# DE PASES	HALO DE INHIBICION
(ORIGEN) DIARREICA 4c	2	++++	3	+++
NO DIARREICA 61	2	+++	3	++++
6B	2	+++	3	++++
COMERCIAL 9	2	+++	3	+++
SN 1	2	+++	3	++++

HALO DE INHIBICION MAXIMO 3cm. = ++++

TABLA 2.

PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE *E. coli* POR ACCION DE LOS METABOLITOS
DE *Lactobacillus* EN MEDIO SIN BUFFERAR.

CULTIVO TOTAL

CEPA DE <i>Lactobacillus</i>	CON PASE ⁴ x 10	%	SIN PASE ⁴ x 10	%
(ORIGEN) DIARREICA 4c	3.0	0.1	850.0	29.76
NO DIARREICA 61	27.5	0.96	8.0	0.28
68	0.7	0.02	72.0	2.5
COMERCIAL 9	2.7	0.09	8.0	0.28
SN 1	0.5	0.01	60.0	2.12

CONTROL POSITIVO = 2856×10^4 col/ml.

TABLA 2.

PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE E.coli
POR ACCION DE LOS METABOLITOS DE
Lactobacillus EN MEDIO SIN
BUFFERAR.

CULTIVO TOTAL

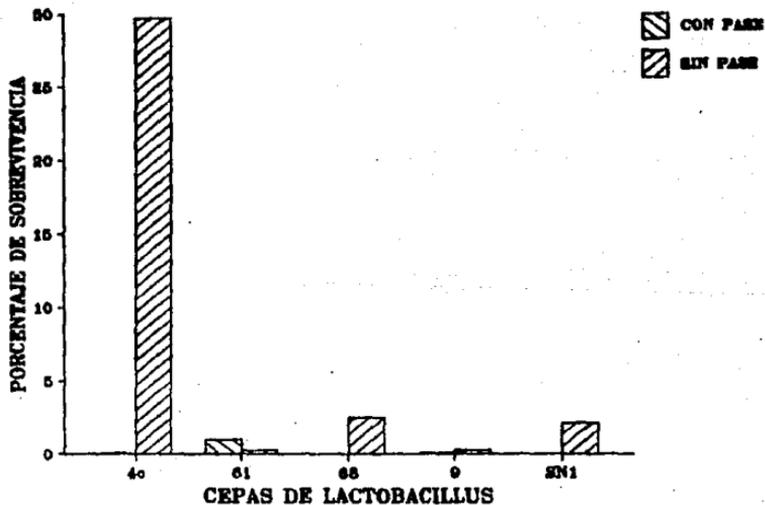


TABLA 3.

PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE *E. coli* POR ACCION DE LOS METABOLITOS
DE *Lactobacillus* EN MEDIO SIN BUFFERAR.

SOBRENADANTE

CEPA DE <i>Lactobacillus</i>	CON PASE x 10 ⁴	%	SIN PASE x 10 ⁴	%
(ORIGEN) DIARREICA 4c	1.05	0.037	2.4	0.084
NO DIARREICA 61	3.3	0.11	1.1	0.03
68	0.1	0.003	548.0	19.21
COMERCIAL 9	1.3	0.04	40.0	1.40
SN 1	1.1	0.03	90.0	3.1

CONTROL POSITIVO = 2856 x 10⁴ col/ml.

TABLA 3.

PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE E. coli
POR ACCION DE LOS METABOLITOS DE
Lactobacillus EN MEDIO SIN
BUFFERAR.

SOBRENADANTE.

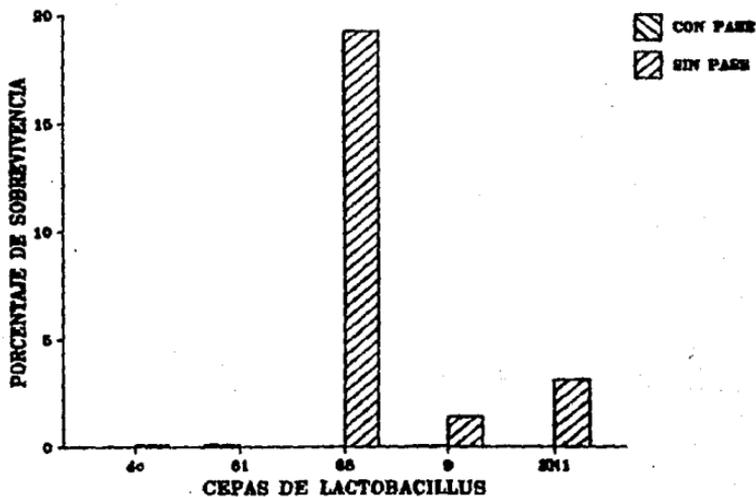


TABLA 4.

PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE E. COLI POR ACCION DE LOS METABOLITOS
DEL POOL DE CEPAS DE Lactobacillus TRABAJADAS.

POOL DE <u>Lactobacillus</u>	% DE COLONIAS 4 x 10	% DE SOBREVIVENCIA
---------------------------------	----------------------------	--------------------

CULTIVO TOTAL CON PASE	248.3	8.69
---------------------------	-------	------

SOBRENADANTE CON PASE	50.1	1.75
--------------------------	------	------

CONDICIONES OPTIMAS	49.6	1.76
---------------------	------	------

CONTROL POSITIVO = 2856×10^4 col/ml.

MEZCLA DE CEPAS: 4c, 61, 68, 9 y SN

FIGURA 4.

PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE E.coli
POR ACCION DE LOS METABOLITOS DEL
POOL DE CEPAS DE LACTOBACILLUS
TRABAJADAS.

* CULTIVO TOTAL CON PASE

** SOBRENADANTE CON PASE

*** CONDICIONES OPTIMAS.

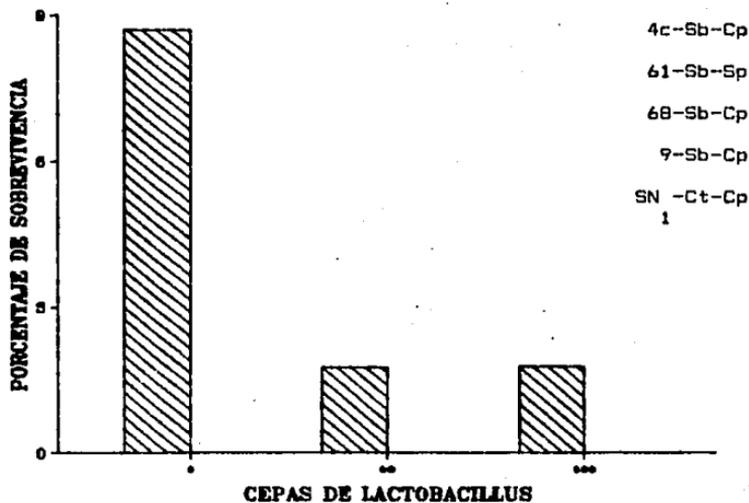


TABLA 5.

CEPAS DE *Lactobacillus* Y SU VALOR DE pH A DIFERENTES TIEMPOS EN
MEDIO SIN BUFFERAR, SIN FASE.

CEPA DE <i>Lactobacillus</i>	0 HORAS	4 HORAS	24 HORAS
pH			
(ORIGEN)			
DIARREICA			
4c Ct-Sp	5.2	5.1	5.1
4c Sb-Sp	5.1	5.1	5.1
NO DIARREICAS			
61 Ct-Sp.	6.8	6.2	6.2
61 Sb-Sp.	6.8	6.2	6.3
68 Ct-Sp.	6.8	6.3	6.2
68 Sb-Sp.	6.8	6.3	6.3
COMERCIAL			
9 Ct-Sp.	5.0	5.0	5.0
9 Sb-Sp.	5.0	5.1	5.2
SN Ct-Sp.	5.2	5.0	5.0
1			
SN Sb-Sp.	5.1	5.2	5.3
1			
CONTROL POSITIVO	6.8	6.1	6.0

Ct-Sp. = CULTIVO TOTAL SIN FASE.

Sb-Sp. = SOBRENADANTE SIN FASE.

FIGURA. 5

CEPAS DE Lactobacillus Y SU
VALOR DE pH A DIFERENTES
TIEMPOS EN MEDIO SIN
BUFFERAR, SIN FASE

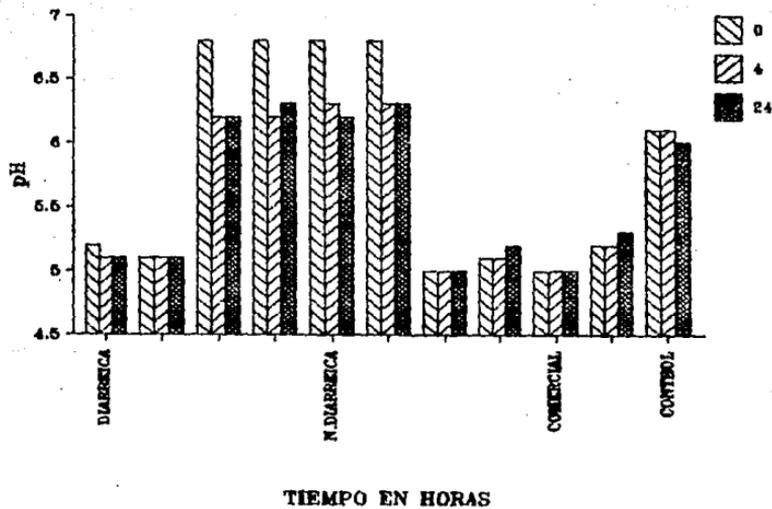


TABLA 6.

CEPAS DE *Lactobacillus* Y SU VALOR DE pH A DIFERENTES TIEMPOS EN
MEDIO SIN BUFFERAR, CON FASE.

CEPA DE <i>Lactobacillus</i>	0 HORAS	4 HORAS	24 HORAS
pH			
(ORIGEN)			
DIARREICA			
4c Ct-Cp.	5.0	5.0	5.0
4c Sb-Cp.	5.0	5.2	5.1
NO DIARREICA			
61 Ct-Cp.	6.5	6.4	6.5
61 Sb-Cp.	6.0	5.6	5.6
6B Ct-Cp.	6.7	6.6	6.7
6B Sb-Cp.	6.6	6.4	6.4
COMERCIAL			
9 Ct-Cp.	5.1	5.0	5.0
9 Sb-Cp.	5.1	5.2	5.3
SN Ct-Cp.	5.0	5.0	5.0
1			
SN Sb-Cp.	5.0	5.1	5.2
1			
CONTROL POSITIVO	7.0	6.4	6.0

Ct-Cp. = CULTIVO TOTAL CON FASE.

Sb-Cp. = SOBRENADANTE CON FASE.

FIGURA. 6

CEPAS DE Lactobacillus Y SU
VALOR DE pH A DIFERENTES
TIEMPOS EN MEDIO SIN
DIFFERAR, CON PASE

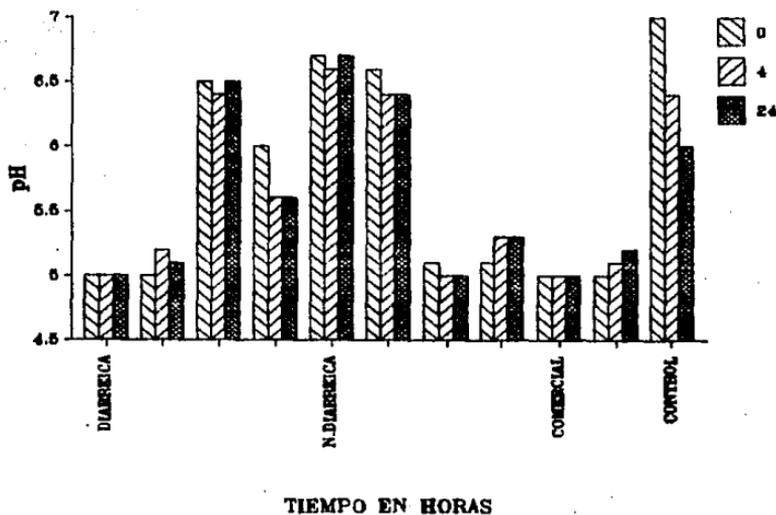


TABLA 7.

PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE *E. coli* POR ACCION DE DIFERENTES
ACIDIFICANTES VEGETALES EN MEDIO BUFFERADO.

ACIDIFICANTE	DILUCION	%
VINAGRE DE ALCOHOL DE CARA	1:2	-
	1:4	-
	1:8	0.0017
	1:16	0.0011
VINAGRE DE MANZANA	1:2	-
	1:4	-
	1:8	0.0085
	1:16	0.0067
ACIDO ACETICO DILUIDO AL 5%	1:2	-
	1:4	-
	1:8	-
	1:16	-
	1:32	-
	1:64	0.12
	1:128	0.11
1:256	0.09	
ACIDO ACETICO DILUIDO 1:1000	1:2	-
	1:4	-
	1:8	-
	1:16	0.032
	1:32	0.040

CONTROL (+) = 2826×10^4 col/ml.

FIGURA. 7

PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE
E.coli POR ACCION DE DIFERENTES
ACIDIFICANTES VEGETALES EN MEDIO
BUFFERADO.

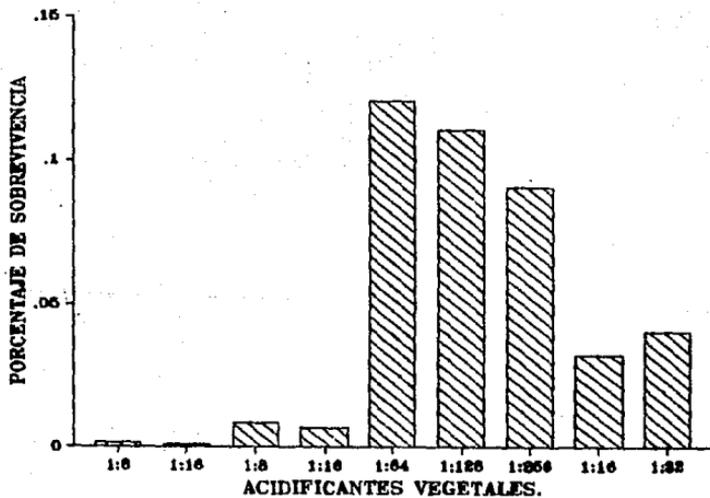


TABLA 8.

ACIDIFICANTES VEGETALES Y SU VALOR DE pH A DIFERENTES TIEMPOS EN
MEDIO BUFFERADO.

ACIDIFICANTE VEGETAL	DILUCION	0 HORAS pH	4 HORAS	24 HORAS
VINAGRE DE MANZANA	1:2	3.9	4.0	4.0
	1:4	4.2	4.2	4.2
	1:8	4.4	4.5	4.5
	1:16	4.8	4.8	4.7
VINAGRE DE ALCOHOL DE CAÑA	1:2	3.9	3.9	3.9
	1:4	4.2	4.2	4.2
	1:8	4.4	4.4	4.4
	1:16	4.7	4.7	4.7
ACIDO ACETICO AL 5%	1:2	3.4	3.6	3.6
	1:4	3.6	3.6	3.5
	1:8	3.7	3.6	3.7
	1:16	3.9	3.8	3.8

CONTROL (+) = 6.5

FIGURA 8.

ACIDIFICANTES VEGETALES Y SU
VALOR DE pH A DIFERENTES
TIEMPOS EN MEDIO BUFFERADO

VINAGRE DE MANZANA.

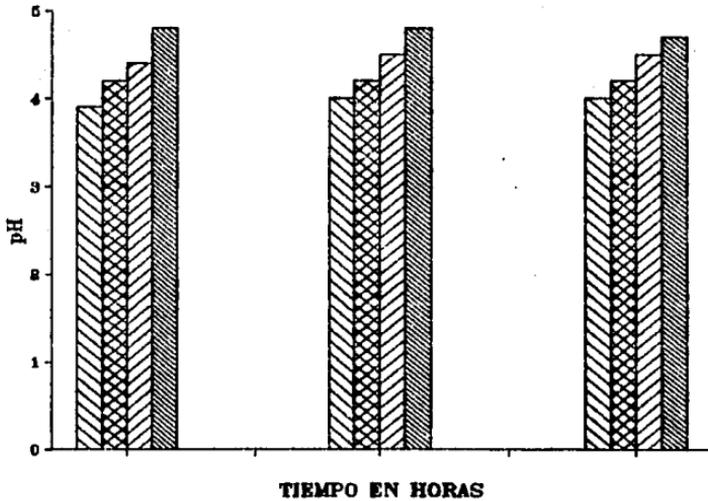


FIGURA 8.

ACIDIFICANTES VEGETALES Y SU
VALOR DE pH A DIFERENTES
TIEMPOS EN MEDIO BUFFERADO
VINAGRE DE ALCOHOL DE CAÑA.

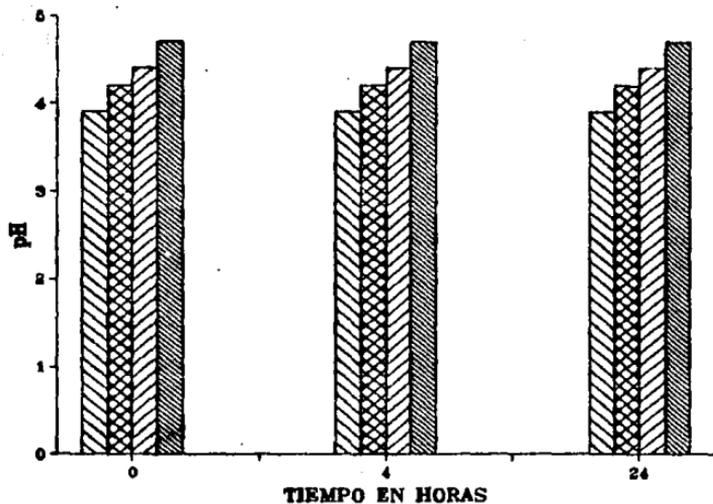


FIGURA 8.

ACIDIFICANTES VEGETALES Y SU
VALOR DE pH A DIFERENTES
TIEMPOS EN MEDIO BUFFERADO

ACIDO ACETICO AL 5%.

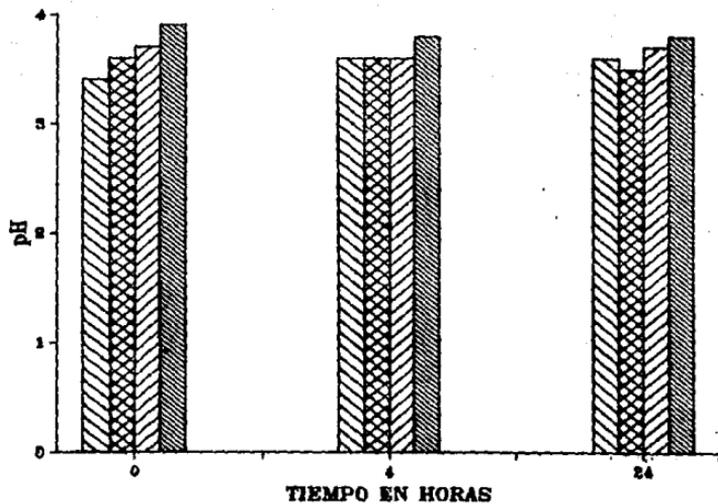


TABLA 9.

PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENTEROTOXIGENICA DE E.coli
POR Lactobacillus EN ASA LIGADA.

SIN PASE		
CEPA DE <u>Lactobacillus</u>	CULTIVO TOTAL % DE INHIBICION	SOBRENADANTE % DE INHIBICION

(ORIGEN) DIARREICA 4c	100.0	5.26

NO DIARREICA 61	100.0	89.48
68	100.0	93.69

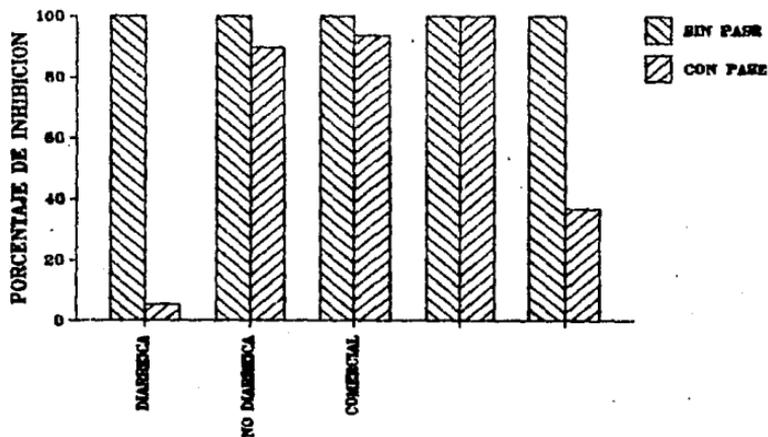
COMERCIAL 9	100.0	100.0
SN 1	100.0	36.8

CONTROL POSITIVO = 4.75 ml.

FIGURA 9.

PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA
ACTIVIDAD ENTEROTOXIGENICA
DE E.coli POR Lactobacillus
EN ASA LIGADA.

CULTIVO TOTAL



CEPAS DE LACTOBACILLUS

TABLA 10.

PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENTEROTOXIGENICA DE E. coli
POR Lactobacillus EN ASA LIGADA.

CON PASE		
CEPA DE <u>Lactobacillus</u>	CULTIVO TOTAL % DE INHIBICION	SOBRENADANTE % DE INHIBICION

(ORIGEN) DIARREICA 4c	100.0	15.78

NO DIARREICA 61	78.95	78.95
68	95.79	91.58

COMERCIAL 9	5.27	5.26
SN 1	100.0	15.79

CONTROL POSITIVO = 4.75 ml.

FIGURA. 10

PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA
ACTIVIDAD ENTEROTOXIGENICA
DE Ecoli POR Lactobacillus
EN ASA LIGADA.

SOBRENADANTE

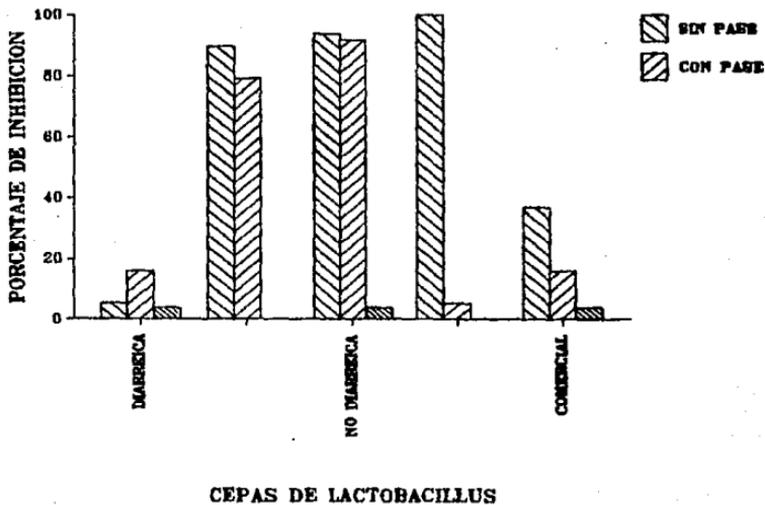


TABLA 11.

PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE E.coli DESPUES DEL TRATAMIENTO POR
VIA ORAL CON VINAGRE.

POSIS	CONTROLES	GAZAPOS*	% SOBREV.	% INHIB.
<u>E.coli</u>	<u>E.coli</u>	<u>E.coli</u> + vinagre CFU		
1.1×10^7	244.76×10^3	0.8407×10^3	0.35	99.65

* 2 CAMADAS DE GAZAPOS.

TABLA 12.

PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE *E.coli* DESPUES DEL TRATAMIENTO POR
VIA ORAL CON *L.fermentum*.

DOSIS <i>E.coli</i>	CONTROLES		GAZAPOS&	% SOBREV.	% INHIB.
	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i> +	<i>L.fermentum</i>		
			CFU		
1.1x10 ⁷	244.76x10 ³		5.07x10 ³ *	2.07	97.92
1.1x10 ⁷	244.76x10 ³		0.57 **	0.24	99.76

* CULTIVO TOTAL CON PASE.

** SOBRENADANTE CON PASE

& SE USARON 2 CAMADAS DE GAZAPOS.

NOTA: SE USO LA CEPA 68.

TABLA 13.

RESULTADOS DE HISTOPATOLOGIA DEL INTESTINO DELGADO DE GAZAPOS USANDO
ACIDIFICANTES VEGETALES + E.coli.

DOSIS	CAMBIOS OBSERVADOS	GRADO DE LESION
0.3 ML DE VINAGRE	DEGENERACION CELULAR LEVE, DISTORSION DE ALGUNAS VELLOSIDADES.	+
0.7 ML DE VINAGRE	DEGENERACION EPITELIAL SEVERA, DISTORSION DE VELLOSIDADES.	++
1.0 ML DE VINAGRE	DEGENERACION DE CELULAS EPITELIALES SEVERA, DISTORSION DE ALGUNAS VELLOSIDADES, DESPRENDIMIENTO DE MUCOSA.	+++
1.5 ML DE <u>E.coli</u>	DEGENERACION CELULAR LEVE.	+
1.5 ML DE <u>E.coli</u> + 0.3 ML DE VINAGRE	NECROSIS DE VELLOSIDADES CONGESTION Y HEMORRAGIAS MODERADAS, INFLAMACION - AGUDA.	+++
CONTROL	SIN CAMBIOS PATOLOGICOS APARENTES	

TABLA 14.

RESULTADOS DE HISTOPATOLOGIA DEL INTESTINO DELGADO DE GAZAPOS USANDO
ACIDIFICANTES BIOLÓGICOS + E.coli.

DOSIS	CAMBIOS OBSERVADOS	GRADO DE LESION
1.5 ML DE <u>E.coli</u> + 0.6 ML DE Sb-Cp. DE CEPA 68	DEGENERACION VACUOLAR DE ALGUNAS CELULAS DE LA SUPERFICIE DE LAS VELLOSIDADES.	-/+
1.5 ML DE <u>E.coli</u> + 0.6 ML DE Ct-Cp. DE CEPA 68	DEGENERACION VACUOLAR DE ALGUNAS CELULAS DE LA SUPERFICIE DE LAS VELLOSIDADES.	+/-

Sb-Cp. = SOBRENADANTE CON PASE.
Ct-Cp. = CULTIVO TOTAL CON PASE.

5. DISCUSION.

Debido a que la incidencia de diarreas en las granjas porcícolas sigue siendo causante de pérdidas económicas a pesar del mejoramiento en sistemas de producción, es necesario tratarlas y la forma actual - más común es con el uso de antibióticos o quimioterápicos, los cuales crean una serie de alteraciones en la flora fisiológica digestiva --- causando un desequilibrio de la misma, ayudando a la proliferación de la flora patógena capaz de producir enfermedades infecciosas. Esto -- lleva consigo determinados problemas infecciosos de tipo local o general y sobre todo una disminución de la digestibilidad de todos los --- componentes de los alimentos, con lo cuál la producción se ve disminuida. Como consecuencia de todo esto, cada vez es más conveniente la utilización de PROBIOTICOS que ayuden al establecimiento de una flora con gran potencial de fermentación. Y de ACIDIFICANTES VEGETALES --- (Kultibol, 1983).

Se ha observado gran inhibición del crecimiento in vitro con el uso de Lactobacillus sobre Salmonella, E.coli, Staphylococcus aureus - (Shahani et al., 1974; Wheeler et al., 1952, Dahiya and Speck, 1968; - Gilliland and Speck, 1977). Se ha demostrado el efecto antagonico de - Lactobacillus y E.coli in vitro, en cajas de agar donde hay una -- amplia zona de inhibición de E.coli y otros microorganismos (Fuller, R. and B.E. Brooker, 1974. I de G. Mitchell and R. Kenworthy, 1976, -- reportaron que una zona de inhibición > 0.5 cm de diámetro = +++, ---- 0.5-0.3 cm de diámetro = ++, 0.3-0.1 cm de diámetro = +, y si no hubo zona de inhibición = -. En este estudio se encontró que la actividad anti-bacterial estuvo entre +++ y ++++ en las cinco cepas de Lactoba--

cillus trabajadas. Ver tabla 1.

Experimentos in vivo, indican como los Lactobacillus inhiben la enterotoxina inducida por Escherichia coli (citado por Tannock, G.W. et al., 1982). Tambien Fuller, R. and B.E. Brooker, 1974, mencionan la acción antagonica entre Lactobacillus y E. coli en donde los Lactobacillus ejercen una acción bacteriostática frente a E. coli. En este trabajo se encontró que el mínimo porcentaje de sobrevivencia de E. coli por la acción del cultivo total de Lactobacillus con pase en medio sin bufferar (Fig. y Tabla 2) fue de 0.01% para la cepa SN .

Y sin pase de 0.28% para la cepa 61 y 9. Como se reportó en la tesis de Marquez Codina, 1989; siendo semejantes los resultados en medio bufferado. El porcentaje tan bajo usando pase, puede deberse a que hay un mayor crecimiento de Lactobacillus, mayor concentración de bacteriocinas, metabolitos y de sustancias con actividad anti-E. coli efectiva que no se potencializan cuando no se hace pase. Con el uso de sobrenadante con pase en medio sin bufferar (Fig. 2 y Tabla 3) el porcentaje de sobrevivencia es sumamente pequeño 0.003% para la cepa 68 y sin pase de 0.03% para la cepa 61. En la tesis de Márquez Codina, 1989 se reportó que con el uso de medio bufferado el menor porcentaje de sobrevivencia fue de 0.04% para la cepa 68 y 0.01% para la cepa 4c. Como se observa con el uso de medio sin bufferar la inhibición del crecimiento de E. coli es menor, lo que puede deberse a que cada cepa de Lactobacillus tiene un pH óptimo en el cual crece mejor y libera sus metabolitos de una manera más eficiente. Lo que no sucedió con el uso de medio bufferado, con el cual se permitió un crecimiento ligeramente mayor de E. coli. También aquí posiblemente los iones PO_4^{3-} contenidos -

en el medio bufferado bloquean o alteran alguna (s) ruta (s) metabólica(s) de los Lactobacillus impidiendo que su actividad sea completa.

En cuanto al valor de pH se observa en la (Fig. y Tabla 5 y 6) puede decirse que el mecanismo por el cual actúa la cepa 6B no es solamente por disminución de pH, ya que es casi neutro, situación similar se observa en las otras cepas donde el pH oscila como mínimo de 5 y máximo de 6.8, sino posiblemente por bacteriocinas como se mencionó anteriormente u otro de los mecanismos previamente propuestos (Tortuero, F. 1973; Stern and Storrs, 1975; Shahani et al., 1977; Gilliland and Speck 1977; Wolter, R. et N Henry, 1982; Moose, M. 1987).

Con el uso de sobrenadante sin pase en medio sin bufferar, ver (fig. y tabla 3) comparado con lo que se reporta en la tesis de Marquez Córdina, 1989; se observa que se obtuvieron mejores beneficios con el uso de medio sin bufferar. Por lo que se sugiere que cuando se use una cepa de Lactobacillus como Probiótico se le realizan pases para concentrar las sustancias producidas por ellos.

Savage, 1977; (citado por Tannock, G.W. et al., 1982), encontró que la alimentación con cultivos de Lactobacillus a animales es un problema de uso práctico, a menos que las cepas bacterianas sean cuidadosamente seleccionadas de acuerdo a su habilidad para formar poblaciones estables en el tracto gastrointestinal. Con el empleo de la mezcla de Lactobacillus en medio sin bufferar, (ver Tabla 4) usando sobrenadante con pase y en las condiciones óptimas el porcentaje de sobrevivencia de E.coli es muy bajo 1.75% y 1.76% respectivamente. Y con la mezcla de cultivo total con pase se observó que es de 8.69%, la cual comparado con el 100%, también es bajo. Por lo que se sugiere que para la elaboración de un Probiótico es importante estudiar todo el comportamiento

y condiciones de la cepa individualmente, y se podría usar una sola cepa si esta es buena.

Al medir el pH (Fig. y Tabla 5,6) y su relación con el grado de acidez muy marcada, a diferencia de los vinagres en el cuál se obtuvo valores de pH más ácidos. Esto puede servir para explicar porque en el estudio histopatológico con el empleo de vinagres, se presentaron lesiones en el intestino de gacapos ver (Tabla 14).

El rol que juegan los ácidos orgánicos para ayudar a acidificar el estómago y reducir los conteos bacteriales fue investigado por el Dr. Gary Cromwell en la Universidad de Kentucky, en este experimento usó Acid-Pak 4-Way, un acidificante comercial de Alltech, que contiene una combinación de ácidos orgánicos (cítrico, sórbico y benzoato), también una cantidad substancial de células bacteriales Lactobacillus acidophilus y Streptococcus faecium y enzimas (citado por Easter, R.A. 1987). También reportó que acidificando la leche de beber se ejerce una acción bacteriostática, reduciendo de esta forma bacterias contaminantes como E.coli enterotoxigénica en el sistema digestivo. Al disminuir el pH en el estómago la actividad del pepsinógeno aumenta dando como resultado un aumento en la eficiencia digestiva. Packett and Butcher (1963) reportaron que con la adición de ácido cítrico a la dieta de vacas se presenta un efecto curativo sobre las diarreas. En este trabajo se encontró que in vitro efectivamente los ácidos orgánicos como el ácido acético del vinagre inhibe el crecimiento de E.coli. Se obtuvo además que la máxima dilución de los acidificantes en medio bufferado que inhibe el 100% de crecimiento de E.coli es 1:4. Aún cuando diluidos hasta 1:16 y aún 1:64 podrían ser utilizados, ver (Fig y Tabla 7). Marquez --

Codina, 1989: reporto que con el uso de acidificantes vegetales en medio sin bufferar la máxima dilución que inhibe el 100% es 1:4.

Como se observa en la (Fig y Tabla 8) aparentemente no hubo variación del valor de pH a diferentes tiempos usando medio bufferado. Y con el uso de medio sin bufferar como se reportó en la tesis de Marquez Codina 1989; el valor de pH tendió a ser ligeramente más ácido lo que explica el porque con el empleo de medio sin bufferar la dilución máxima inhibitoria del crecimiento de E. coli es 1:8.

Fuller, R. 1975, reportó que experimentos in vivo e in vitro indican que los Lactobacillus se establecen en el intestino previniendo la colonización por Escherichia coli, además de producir sustancias en contra de la enterotoxina. En este trabajo se encontró un porcentaje mayor de inhibición de la actividad enterotoxigénica de E. coli (Fig 9 y Tabla 9 y 10) con el uso de cultivo total con y sin pase, no así con el sobrenadante con y sin pase ya que esta inhibición fue menor, lo que se podría explicar debido a que en la prueba de asa ligada en conejo los Lactobacillus permanecen en contacto 18 hrs. con la E. coli pudiendo seguir liberando mayor cantidad de anti-enterotoxina y bacteriocinas, además podría estar el Lactobacillus adheriéndose y compitiendo por espacio, incrementándose estas acciones mezcladas. Y con el empleo de sobrenadante sólo se tiene la anti-enterotoxina, bacteriocinas, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y el lactato liberado durante el tiempo de incubación.

Otro hecho de interés encontrado a través de este trabajo es el que la administración oral de acidificantes vegetales a gerapos para evaluar el índice de sobrevivencia de E. coli, que como se muestra en la (Tabla 11), es muy eficiente para reducir el crecimiento de esta bacteria

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Lo que coincide con (Scipioni et al., 1978), quien encontró que dietas a las que se les adiciona ácido cítrico favorecen a que el pH de--- crezca y el número de E.coli en estómago y duodeno se vea reducido.

Este mismo investigador en 1980, también mostró reducción en el número de coliformes en varios segmentos del tracto intestinal de cerdos alimentados con ácido fumárico. Los niveles de ácido que el usó estuvieron en el rango de 0.5 a 4.0%. Además se han reportado reducciones en el conteo de E.coli en el duodeno y yeyuno en cerdos alimentados con dietas acidificadas.

En la (Tabla 12) se observa que la cepa de L. fermentum tuvo muy buen efecto en la inhibición de E.coli, principalmente con el uso de sobrenadante con pase que fue de 99.76%, comparandose igual in vitro, lo que pone de manifiesto que probablemente es la competencia por espacio, y la producción de sustancias inhibitorias los principales factores que contribuyen a la supresión de Escherichia coli. Por lo que en base a los resultados obtenidos se sugiere que alimentando a cerdos con productos fermentados con Lactobacillus se produce supresión del crecimiento de E.coli en el tracto digestivo. Estos datos también coinciden con Muralidhara et al., (1977) quien reportó que con la inclusión de Lactobacillus en la dieta de lechones se provoca una disminución en el número de E.coli. Al igual que Ellinger et al., (1978) quien observó disminución en el número de coliformes en las heces de vacas cuando fueron alimentadas con leche adicionada con L.acidophilus.

Moose, Marvin, 1987, reportó que los Lactobacillus y Streptococcus son las especies más comunmente usadas en la terapia de enfermedades intestinales de tipo bacterial. Las cuales son seleccionadas en

base a su habilidad para sobrevivir el paso por el estómago e implementarse en el intestino.

En la Tabla (13 y 14) se observa que los vinagres producen mayor grado de lesión en el epitelio intestinal, a diferencia de los Lactobacillus cuyos efectos fueron casi insignificantes; lo que concuerda con Pollmann, D.S. et al., 1984; quién no detectó alteraciones morfológicas significativas en las examinaciones histológicas, con el uso de preparaciones fermentadas con Lactobacillus.

6. CONCLUSIONES.

En base a los resultados encontrados se puede concluir que:

- a) Los Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum y --
Lactobacillus fermentum de origen porcino, así como los metaboli-
tos que producen, inhiben eficientemente a E.coli in vivo e in vitro
en medio sin bufferar.
- b) Parece que la acción inhibitoria de E.coli por los Lacto-
bacillus es por un conjunto de efectos tales como: producción de --
ciertos metabolitos, bacteriocinas, células en si mismas y por un pH
(ligeramente ácido).
- c) Contrastando con los vinagres cuya acción se debe principal--
mente a su pH ya que desciende hasta 3.4.
- d) En base al estudio histopatológico se recomienda el uso de --
Lactobacillus en el control de diarreas de los lechones durante los --
primeros 5 días de nacidos, ya que son menos agresivos al epitelio --
intestinal que el vinagre. Si se usa este último, se debe cuidar la --
dosis para evitar daños severos que pudieran repercutir en su edad --
adulto especialmente en lo referente al mejor aprovechamiento de los
nutrientes.

7. APENDICE.

AGAR ROGOSA.

Extracto de carne	2.5 g.
Extracto de levadura	1.25 g.
Acido ascórbico	0.25 g.
Peptona de Soya o	
Peptona de Caseína	2.5 g.
Polipeptona	2.5 g.
Acetato de Sodio Anhidro	1.5 g.
Agar Bacteriológico	5.5 g.
Lactosa	2.5 g.
Agua Destilada	c.b.p. 500 ml.

CALDO SOYA TRIPTICASEINA (pH = 7.0).

Peptona de caseína	17.0 g.
Peptona de soya	3.0 g.
Cloruro de sodio	5.0 g.
Fosfato dipotásico	2.5 g.
Dextrosa	2.5 g.
Agua Destilada	c.b.p. 1000 ml.

CALDO SOYA TRIPTICASEINA BUFFERADO (pH = 6.5)

La misma composición del medio anterior + KH_2PO_4 al 8% y Na_2HPO_4 al 3%

2 4

2 4

REACTIVOS:

SOLUCION BUFFER DE FOSFATOS (PBS) (pH = 7.2)

NaCl	8.0 g.
KCl	0.2 g.
Na HPO _{2 4}	1.15 g.
KH ₂ PO ₄	0.2 g.
Agua Destilada	C.b.p., 1000 ml.

SOLUCION SORENSEN FOSFATO BUFFER 0.1 M (pH = 7.4).

Na ₂ PO ₄	14.2 g. adicionar 1 lt. de agua destilada.
NaH ₂ PO ₄	2.76 g. adicionar 200 ml. de agua destilada.

NOTA: Mezclar 830 ml. del fosfato dibásico + 170 ml. del fosfato monobásico para obtener fosfato buffer 0.1 M.

B. BIBLIOGRAFIA.

- Annon, R. 1985, Citric acid as a feed additive. Roche Vitac-2-Animal Nutrition and Vitamin Views. AS-1/1-1/8.
- Barnes, H.J. 1987. Escherichia coli problems in poultry production. Alltech's Third Annual Symposium. Lexington. Ky. April.
- Beck, C., and H. Necheles. 1980. Beneficial effects of administration of Lactobacillus acidophilus in diarrhea and other intestinal disorders. Am. J. Gastroenterol. 35: 522-530.
- Buenrostro, J.L., F.H. Kratzer, 1983. Effect of Lactobacillus inoculation and antibiotic feeding of chickens on availability of dietary biotin. Poultry Science. 62: 2022-2029.
- Burnell, T.W., G.L. Cromwell and T.S. Stahly, 1986. Organic acid, copper sulfate and antibiotic additions to starter diets for weaning pigs. J. of Animal Sci. 65 (suppl. 1):22. Abstract.
- Brigitte Bedek, Munchen. 1987. Probiotics in Animal Feeding Effects on Performance and Animal Health. Feed Magazine International. A-21-24.
- Booker, B.E. and Fuller, R. 1975. Adhesion of Lactobacilli to the chicken crop epithelium. J. Ultrastruct. Res., 52: 21-31.
- Brown, J.P. 1977. CRP. Press. INC. 18. 901. B.3.
- Collier, B. and B. Hardy, 1985. The use of enzymes in pig and poultry

feeds. Part. I. Feed Compounder. March. 14.

Cromwell, G.L. & T.W. Burnell. 1987. Acid-antibiotic-copper interactions in swine starter diets. Animal Health & Nutrition. April: 14-16.

Cornelius, Steven G. St. Paul, Minn. 1988. Acidified weanling pig diets gain increasing attention. Nutrition & Health. 1: 11-12.

Cowie, R.S. 1964. The use of dilute acids in the treatment of white scour in calves. The Vet. Rec. 76: 1516-1520.

Chandan, R.C., Angyle, P.J. & Jones N. 1969. A proteolytic activity of lactic cultures. Journal of Dairy Science. 52. 894 (Abstract).

Fuller, R. and E. Brooker. 1974. Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl. The American J. of Clinical Nutrition. 27: 1305-1311.

Ducluzeau R. et al Raibaud P. 1979. Ecologie microbienne du tube digestif. Ces microbes qui nous protègent. Masson ed. Paris.

Easter, R.A. The role of acidification in pig rearing. 1987. Biotechnology in the Feed Industry. June: 209-216.

Edmonds. M.S., D.A. Izquierdo and O.H. Baker. 1985. Feed additive studies with newly weaned pigs. Efficacy of supplemental copper, antibiotics and organic acids. J. Anim. Sci. 60:42.

Ellinger, D.K., L.D. Muller, and P.J. Glantz. 1978. Influence of feeding fermented colostrum and Lactobacillus acidophilus on fecal flora and selected blood parameters of young dairy calves. J. Dairy Sci. 61 (Su-

ppl. 1): 126. Abstract.

Etheridge, C., Seerley, R.W. and Wyatt, R.D. 1984. Journal of Animal Science, 58: 1396.

Falkowski, J.F. and F.X. Aherne. 1984. Fumaric acid and citric acid as feed additives in starter pig nutrition. J. Anim. Sci. 58: 935-938.

Fallon, R.J. and F.J. Harte. 1985. Effect of method of introducing ---- purchased calves to and libitum system of warm milk replacer feeding on their performance. Ir. J. Agric. Res. 25: 21-32.

Fallon, R.J. 1986. Acidification of calf and pig diet. Proceedings. Alltech's Second Biotechnology Symposium. Lexington. Ky. April.

Fuller, R. 1973. Ecological studies on the Lactobacillus flora associated with the crop epithelium of the fowl. J. Appl. Bact. 36: 131-139.

Fuller, R. and E. Brooker. 1974. Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl. The American J. of Clinical Nutrition. 27: 1305-1311.

Fuller, R. 1977. The importance of Lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. Poulit Sce., 18: 85-94.

Fuller, R., P.A. Barrow, and E.E. Brooker. 1979. Bacteria associated with gastric epithelium of neonatal pigs. Appl. Environ. Microbiol. 35: 582-591.

Fuller, R. 1986. Probiotics. J. Appl. Bacteriol, Sym. Sup. 15-75.

- Garvie, E.I., C.B. Cole., R. Fuller & D. Hewitt. 1984. The effect of yoghurt on some components of the gut microflora and on the metabolism of lactose in the rat. J. of Appl. Bacteriol. 56: 237-245.
- Giesting, D.W. and R.A. Easter, 1985. Response of starter pigs to ---- supplementation of corn-soybean-meal diets with organic acids. J. of - Animal Science. 60: 1288-1294.
- Gilliland, S.E., M.L. Speck, and C.G. Morgan. 1975. Detection of Lactobacillus acidophilus in feces of humans, pigs and chickens. Appl. ----- Microbiol. 30: 541.
- Gilliland, S.E., and M.L. Speck. 1977. Antagonistic action of Lactoba--cillus acidophilus toward intestinal and food-born pathogens in associa--tive culture. Journal Food Prot. 40: 829-833.
- Gilliland, S.E. and M.L. Speck. 1977. Enumeration and identity of ----- Lactobacilli in dietary products. J. Food Protection. 40: 760.
- Gilliland, S.E., M.L. Speck., G.F. Nauyok, J.R. and F.G. Giesbrecht. -- 1978. Influence of consuming non fermented milk containing Lactoba---cillus acidophilus on fecal flora of healthy males. Journal Dairy Sci. 51: 1-10.
- Gilliland, S.E. 1979. Beneficial interrelationships between certain --- microorganisms and humans: Candidates microorganisms for use as dietary adjuncts. J. Food Protect. 42: 164.
- Hamdan, I.Y., and E.M. Mikolajcik. 1974. Acidolin: an antibiotic produ--ced by Lactobacillus acidophilus. J. Antibiot. 27: 631-636.

Henry, R.W. Pickard, D.W. and Hughes, P.F. 1985. Citric acid and fumaric acid as food additives for early-weaned piglets. Anim. Prod. 505-509.

I de G. Mitchell and R. Kenworthy. 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.

Johnson, E.D. and F.M. Calia. 1979. The effect of Lactinex on rabbit ileal loop reactions induced by enterotoxigenic Escherichia coli. Current Microbiology. 2: 207-210.

Jones, C.D. and C.N. Thomas. 1980. The maintenance of strain specificity and bile tolerance when producing stable bacteria. Biotechnology in the feed industry. Alltech, Inc.

Kershaw, G.F. J.R. Luscombe and D.J.A. Cole. 1966. Lactic acid and sodium acrylate: Effect on growth rate and bacterial flora in the intestines of weaned pigs. Vet. Rec. 79: 296.

Kidder, D.E. and M.J. Manners. 1978. Digestium in the pig. Scientifica Bristol.

Kirchgessner, M. and F.X. Roth. 1982. Fumaric acid as a feed additive in pig nutrition. Pig News Informs. 3: 259.

Kovacs, F., B. Nagy and G. Sinkovics. 1972. The gut bacterial flora of healthy early weaned piglets with special regards to factors influencing their composition. Acta Vet. Hung. 22: 327.

Lindgren, S. and O. Refai. 1984. Amylolytic lactic acid bacteria in fish silage. J. Appl. Bacteriol. 57: 221-228.

Lyons, T.P. 1987. Probiotics: an alternative to antibiotics. Pig News and Information. 8 (2): 157-159.

Manners, 1976. The development of digestive function in the pig. Proc. Nutr. 35: 49-55.

Márquez, C.V. 1989. Inhibición de acción entetotóxica del E.coli y de su crecimiento por acidificantes biológicos y vegetales. Tesis. F.E.S.C. UNAM.

Marriot, M.M. and T. Davidson. 1924. The acidity of the gastric contents of infants. Am. J. Dis. Child. 26: 242-552.

Moose, M. 1987. Supplemental bacteria in feeds. National Feed Ingredients Association. (515): 225.

Morin, A., S.A. Saheb, J.G. Bisailon, R. Beasillon, R. Beaudet, and M. Sylvestre. 1980. Effect of culture medium to composition on inhibition of growth to Neisseria gonorrhoeae by Lactobacilli. Current Microbiol. 4: 283-286.

Muralidhara, K.S., G.G. Sheffebey, P.R. Elliker, D.C. England, and W.E. Sandine. 1977. Effect of feeding Lactobacilli on the coliform and Lactobacillus flora of intestinal tissue and feces from piglets. Journal of Food Protection. 40: 228.

Nakumara, L.K. and C.D. Cromwell. 1979. Lactobacillus acidophilus a new starch-hydrolyzing species from swine wastecorn fermentation.

Development in Ind. Microbiol. 20: 532-540.

Necheles, H.M.D., Ph. D., F.A.C.P., F.A.C.G. 1980. Beneficial effects of administration of Lactobacillus acidophilus in diarrheal and other disorders. The American Journal of Gastroenterology. 55-530.

Nilson, K.M., Vakil, J.R. & Shahani, K.M. 1975. B-complex vitamin ---- content of cheddar cheese. Journal of Nutrition. 86: 362-368.

Packett, L.V. and Butcher, G.A. (1963). Effect of dietary sodium citrate and oxytetracycline upon fattening lambs. J. Anim. Sci. 22: 1100-1103

Pollmann, D.S., G.A. Kennedy, Koch and G.L. Allee. 1984. Influence of nonviable Lactobacillus fermentation product on artificially reared pigs Nutrition Reports International. 29 (4): 977.

Puchal Francisco. 1984. Estado actual de los acidificantes en nutrición porcina. Porcira. Vol. IX. No. 101. 38.

Roach, S., D.C. Savage, and G.W. Tannock. 1977. Lactobacilli isolated from the stomach of conventional mice. Appl. Environ. Microbiol. 33: 1197-1203.

Robinson, I.M., S.C. Whipp, J.A. Bucklin and M.J. Allison. 1984. Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs. Appl. Environ Microbiol. 48: 964-969.

Russell. E.G. 1979. Types and distribution of anaerobic bacteria in the large intestine of pigs. Appl. Environ. Microbiol. 37: 187-193.

- Sabin, D.B. 1963. An antibiotic-like effect of Lactobacillus acidophilus. Nature. 199: 811.
- Sandine, W.E. 1979. Roles of Lactobacillus in the intestinal tract. J. Food. Protection. 42: 259.
- Sarra, P.G., and F. Dellaglio. 1985. Colonization of a human intestine by four different genotypes of Lactobacillus acidophilus. Microbiologica. 7: 331-339.
- Scipiono, R., G. Zaaghini and A. Biavati. 1978. Acidified diets in ---- early weaned piglets. Zootec. Nutr. Anim. 4: 201-218.
- Sahahanai, K.M., J.R. Vakil and Kilara. 1977. AQ natural antibiotic --- activity of Lactobacillus acidophilus and bulgaricus. Isolation of acidophilin from Lactobacillus acidophilus. Cultures Dairy Prod. J. 12:8.
- Shahani, K.M. and A.D. Ayebo. 1980. Role of dietary Lactobacillus in -- gastrointestinal microbiology. Am. J. Clin. 33: 2448-2457.
- Shahani, K.M. and Friend, B.A. 1983. Properties of and prospects for -- cultured dairy. Food. Microbiology. 257-269.
- Sheck, M.L. 1976. Interactions among Lactobacilli and man. Journal of Dairy Science. 59: 338.
- Stern, R.M., and A.B. Storrs. 1975. The rationale of Lactobacillus - acidophilus in feeding programs for livestock. Presented at. 36th. Ninnnesota Nutrition Con. Sept. 15-16.

- Suegara, N., M. Morotomi, T. Watanabe, Y. Kawai, and M. Mutai. 1975. Behaviour of microfloraa in the rata stomatch: adhesion of lactobacilli to the keratinized epithelial cells of the rat stomatch in vitro. Infect. Immunol. 12: 173-179.
- Tagg, J.R., A.S. Dajani, and L.W. wannamaver. 1976. Bacteriocins of --- gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40: 722.
- Tannock, G.W. and T.M.B. Smith. 1970. The microflora of the pig stomach and its possible relationship to ulceration of the pars esophaga. J. Comp. Path. 80: 267-359.
- Tannock, G.W., O. Szylit, Y. Duval, and P. Raibaud. 1982. Colonization of tissue surfaces in the gastrointestinal tract of gnotobiotic animal by Lactobacillus strains. Can. J. Microbiol. 28: 1196-1198.
- Tannock, G.W. and R.D. Archibald, 1984. The derivation and use of mice which do not harbour Lactobacilli in the gastrointestinal tract . Can. J. Microbial. 30: 849-853.
- Tortuero, F. 1973. Influence of the implantation Lactobacillus ----- acidophilus in chicks on the growth, fecal conversion, malabsorption of falts syndrome and intestinal flora. Poultru Sci. 52: 197-205.
- Tramer, J. 1966. Inhibitory effect of Lactobacillus acidophilus. Nature. 211: 204-205.
- Varel, V.H., I.M. Robinson and H.J.G. Jung. 1987. Influence of dietary fiber onxylanolytic and cellulolytic bacteria of adult pigs. App. Environ. Microbiol. 53: 22-26.

Vincent, J.G. Veomett, R.C. and R.C. Reiley. 1959. Antibacterial activity associated with Lactobacillus acidophilus. J. Bacteriol. 78: 479-484.

Vogt, H.S., S. Matthes, S. Harmischs. 1981. Preservatives/ organic acids in broiler and layer rations conference on feed additives. Budapest, Hungary.

Watkins, B.A., B.F. Miller., and D.H. Neil. 1982. In vivo inhibitory effects of Lactobacillus acidophilus against pathogenic Escherichia coli in gnotobiotic chicks. Poultry Science. 61: 1298-1308.

Watkins, A.B. and B.F. Miller., 1982. Competitive gut. Exclusion of avian pathogens by Lactobacillus acidophilus in gnotobiotic chicks. Poultry Science. 62: 1772-1779.

Wesney, E, and G.W. Tannock. 1979. Association of rat, pig and fowl biotypes of Lactobacilli with the stomach of gnotobiotic mice. Microbial Ecology. 5: 35-42.

Wheater, D.M., Hirsch, A. and Mattick, A.T.R. 1951. "Lactobacillin" an antibiotic from Lactobacillus. Nature. 168: 369.

Wolter, R., N. Henry. 1982. Les "Probiotiques" en alimentation animale. Rec. Med. Vet. 3: 283-290.

Wu, J.F. 1986. The microbial function in developing action specific microorganisms. Alltech Second Annual Biotechnology Symposium, Lexington, Ky. April.

Yolton, D.P., C. Stanley, and D.C. Savage. 1971. Influence of the indigenous gastrointestinal microbial flora on duodenal alkaline phosphatase activity in mice. *Infection and Immunity* 3: 768-773.