



Universidad Nacional Autónoma
de México

Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLÁN



ESTUDIO DE LA INTERACCION DE
Lactobacilos y Estreptococos
INTESTINALES PORCINOS EN LA ACTIVIDAD
DE Escherichia coli
ENTEROTOXIGENICA

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 :
MARIA DEL CARMEN (GARCIA BORES

ASESORA:

M. en C. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE

COASESORA:

M. en C. VIRGINIA LARA SAHAGUN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR

DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de Tesis: Estudio de la interacción de Lactobacilos y Estreptococos Intestinales Porcinos en la Actividad de Escherichia coli Enterotoxigénica.

que presenta la pasante: María del Carmen García Botes con número de cuenta: 8857407-3 para obtener el TITULO de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 10 de Febrero de 1995

PRESIDENTE	M. en C. Clara Ines Alvarez Manrique	<i>Clara Ines Alvarez M.</i>
VOCAL	Q.F.B. Marcela Hernández Vargas	<i>Marcela Hernández Vargas</i>
SECRETARIO	M. en C. Susana E. Mendoza Elvira	<i>Susana E. Mendoza Elvira</i>
1er SUPLENTE	M. en C. Stella Maris Reginensi Rivera	<i>Stella Maris Reginensi Rivera</i>
2do. SUPLENTE	M. en C. Sofía Gonzá'	<i>Sofía Gonzá'</i>

UAE/DEP/VAP/01

FALLA DE ORIGEN

Gracias Señor por ser siempre mi guía
en este camino tan difícil. Gracias
por ser mi inspiración en este trabajo
y gracias por todas las bendiciones.
que siempre me haz proporcionado.

Gracias Papá por tu apoyo, por tu
comprensión y por el amor que me
haz brindado siempre.

Gracias Mamá por estar siempre conmigo
cuando más te necesito, por tu amor,
por tu comprensión y por tu inagotable
apoyo.

Gracias José Luis por tu amor tu
confianza y tu apoyo constante.

A ustedes Hermanos que les puedo decir:
Gracias por su cariño de siempre, por
su compañía y por su eterna amistad.

Gracias Clara Inés por dirigirme en uno de los proyectos más importantes de mi vida, pero sobre todo por su sincera y grata amistad.

Gracias a toda mi familia por el amor que nos ha mantenido unidos siempre.

Gracias a mis amigos de siempre por su incondicional amistad.

Gracias Ignacio por el apoyo y la ayuda que siempre me brindó.

Gracias a todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron en la elaboración de este trabajo y en el desempeño en general de mi carrera profesional.

Gracias a todos ustedes porque sin su ayuda hubiese sido imposible la realización de este trabajo.

Señor a TI, que siempre haz estado
a mi lado te dedico este trabajo,
hasta el momento el más importante
de mi vida.

Con admiración y respeto dedico este
trabajo a mis padres por su amor,
comprensión y cariño de siempre, ya
que sin su incansable lucha no me
hubiese sido posible lograr este
objetivo.

Dedico este trabajo a todos mis
Profesores por la interminable
fuente de conocimientos y
experincias que simpre me
brindaron.

I N D I C E

1.0	INTRODUCCION	1
1.1	ANTECEDENTES	1
1.1.1	HISTORIA	5
1.1.2	COMPOSICION DE LOS PROBIOTICOS	7
1.2	INTERACCIONES BACTERIANAS EN EL INTESTINO	8
1.2.1	METODOS PARA EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES	
	BACTERIANAS	8
1.2.2	TIPOS DE INTERACCIONES BACTERIANAS	10
1.2.3	INTERACCIONES QUE AFECTAN LOS NIVELES DE LAS CEPAS	10
1.2.4	ANTAGONISMOS BACTERIANOS	11
1.2.5	SINERGISMOS BACTERIANOS	12
1.2.6	INTERACCIONES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD METABOLICA	13
1.2.7	INTERACCIONES: TRANSFERENCIA DE GENES	14
1.3	INTERACCIONES METABOLICAS EN EL INTESTINO	14
1.4	LA FLORA INTESTINAL Y LA RESISTENCIA A ENFERMEDADES	15
1.4.1	RESISTENCIA A LA COLONIZACION	16
1.4.2	SUPRESION DE LA MULTIPLICACION DE PATOGENOS POR EL	
	EFFECTO DE LA FLORA INTESTINAL	17
1.4.3	MECANISMOS RESPONSABLES DE LA SUPRESION DE PATOGENOS	17
1.5	SELECCION DE CEPAS PARA EL USO DE PROBIOTICOS	20
1.5.1	PRIMER PASO EN LA SELECCION DE CEPAS BACTERIANAS	20
1.5.2	LAS ESPECIES Y LA VIABILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS	
	PARA PROBIOTICOS	21
1.5.3	RESISTENCIA A CONDICIONES "IN VIVO"	21

1.5.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	22
1.6 PROBIOTICOS PARA CERDOS	23
1.6.1 TRACTO DIGESTIVO	24
1.6.2 BACTERIAS ACIDO LACTICAS INDIGENAS	24
1.6.3 EFICACIA	26
1.6.4 INFLUENCIA EN LA MICROFLORA DIGESTIVA	26
1.6.5 FUNCION DE LAS BACTERIAS DE LOS PROBIOTICOS	28
1.6.6 TECNICAS PARA AISLAR LAS CEPAS	29
2.0 JUSTIFICACION	30
3.0 OBJETIVOS	31
4.0 METODOLOGIA	33
5.0 RESULTADOS	39
6.0 DISCUSION.....	52
7.0 CONCLUSIONES.....	56
BIBLIOGRAFIA	58

1.0 INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES

En la industria porcícola se presentan a menudo casos de diarrea en lechones antes del destete; un número importante de ellos han sido atribuidos al efecto de cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*. Es una de las causas más importantes de muerte en éstos provocando severas pérdidas a la porcicultura. (45)

Intentos por controlar estos cuadros diarréicos que generalmente se presentan durante el período neonatal intermedio (<6 días de edad) y alrededor de las 3 a 9 semanas de edad, han dado lugar a numerosas investigaciones sobre su naturaleza y control. (20)

Muchos de los bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, miembros de este grupo son naturales del tracto gastrointestinal. (3)

La *E. coli* es una bacteria Gram negativa, en forma de bastoncillo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Crece en la mayoría de los medios de cultivo que se utilizan en el laboratorio a temperaturas comprendidas entre los 15 y los 45 °C, siendo la temperatura óptima los 37 °C. (28)

Es relativamente sencillo aislar el *E. coli* con medios selectivos como el agar Mac Conkey, el agar Azul de Metileno Eosina (EMB) entre otros, donde esta bacteria da coloraciones específicas. (3,28)

La patogenicidad de esta bacteria es debida a la presencia de fimbrias específicas y a la producción de la toxina lábil al calor LT y la estable al calor ST entre otras. Una cepa de *E. coli* puede producir las dos o sólo una de estas toxinas. La asociación entre diarrea y *E. coli* toxigénica es bien conocida y es usualmente el resultado de la acción de las enterotoxinas termoestables (ST) o termolábiles (LT) o ambas en el intestino delgado. La unión específica de ST con las células intestinales de rata en particular, ha demostrado que en las membranas de borde de cepillo hay un receptor protéico implicado en el proceso de unión. Después la toxina estimula la adenilato ciclasa y también el incremento en la concentración intracelular de GMPC. (22,28)

La toxina LT ha recibido considerable atención porque cruza antigénicamente con la toxina de cólera. Por clonación el gen estructural de la LT y la traslación de el plásmido producido en células *E. coli*, se ha demostrado que la estructura de LT consiste de una proteína de un peso molecular de 25,500 con una actividad similar a la de la adenilato ciclasa. (28)

El control de la colibacilosis causada por *E. coli*, puede efectuarse por diversos métodos, uno de ellos es la administración de un probiótico, que contribuya con la flora normal del intestino del lechón para así evitar la muerte por esta enfermedad. (34)

La patogenicidad de esta bacteria es debida a la presencia de fimbrias especificas y a la producción de la toxina lábil al calor LT y la estable al calor ST entre otras. Una cepa de *E. coli* puede producir las dos o sólo una de estas toxinas. La asociación entre diarrea y *E. coli* toxigénica es bien conocida y es usualmente el resultado de la acción de las enterotoxinas termoestables (ST) o termolábiles (LT) o ambas en el intestino delgado. La unión especifica de ST con las células intestinales de rata en particular, ha demostrado que en las membranas de borde de cepillo hay un receptor protéico implicado en el proceso de unión. Después la toxina estimula la adenilato ciclasa y también el incremento en la concentración intracelular de GMPc. (22,28)

La toxina LT ha recibido considerable atención porque cruza antígenicamente con la toxina de cólera. Por clonación el gen estructural de la LT y la traslación de el plásmido producido en células *E. coli*, se ha demostrado que la estructura de LT consiste de una proteína de un peso molecular de 25,500 con una actividad similar a la de la adenilato ciclasa. (28)

El control de la colibacilosis causada por *E. coli*, puede efectuarse por diversos métodos, uno de ellos es la administración de un probiótico, que contribuya con la flora normal del intestino del lechón para así evitar la muerte por esta enfermedad. (34)

La palabra Probiótico fue inventada por Parker en 1974, su significado deriva de dos palabras "para la vida" en contraste con una palabra muy familiar "antibiótico" que significa "contra la vida". Paradójicamente el efecto de los probióticos tal vez depende de la actividad antibiótica de la bacteria en el probiótico.

Un probiótico se define como: "Un suplemento alimenticio que contiene microorganismos que ayudan en la protección en contra de una invasión por microorganismos patógenos que puedan afectar la nutrición y el crecimiento del animal. (28,34)

De acuerdo con Parker (1974) la definición original de un probiótico es "Organismos y sustancias que contribuyan con el balance microbiológico intestinal". Esta definición puede abarcar los cultivos, las células y los metabolitos microbianos; de este último grupo puede incluir preparaciones de antibióticos comerciales. (26)

En 1978 Fuller redefinió probióticos como: "Un suplemento alimenticio bacteriano vivo que afecta benéficamente al animal huésped para establecer el balance microbiano intestinal". (19)

Las bacterias utilizadas con mayor frecuencia en la elaboración de los probióticos son: *Lactobacilos spp.*, *Streptococos entéricos* y algunas otras bacterias lácticas. La mayoría de estas bacterias producen metabolitos activos como son las bacteriocinas. (28,46)

Las bacteriocinas son proteínas bacteriales compuestas e inhibitorias para cepas sensibles y pueden ser producidas por bacterias Gram (+) y Gram (-). Las bacterias Gram (+) que producen bacteriocinas son la mayoría bacterias ácido lácticas (LAB) usadas en fermentaciones de alimentos y productos diarios, incluyendo *Lactobacilos*, *Lactococos* y *Pediococos*. (28,22)

Los *Lactobacilos* son especialmente conocidos por sus propiedades bacteriocinogénicas, se ha reportado que aproximadamente el 63% de las cepas de *Lactobacilos acidophilus* producen bacteriocinas, éstas han sido purificadas y se ha demostrado que constituyen una heterogénea clase de péptidos antimicrobianos. (28)

Al administrar un probiótico se busca reestabilizar la protección de la flora natural y su estado nutricional normal, así como favorecer un desarrollo adecuado de su estado de salud. (37)

En nuestro caso específico se probará el efecto inhibitorio de varias cepas de *Streptococos entericos* y *Lactobacilos* sobre varias cepas de *E. coli*. Esto tanto "IN VITRO" como "IN VIVO", con el fin de obtener datos que nos ayuden a definir la calidad de las cepas que se aislaron, para en base a las mejores, tanto en actividad como en estabilidad, elaborar un posible probiótico utilizando dichas bacterias seleccionadas. (11,20,28)

1.1.1 HISTORIA

Se inoculaba la leche para inducir la fermentación desde el año (2500 A.C.). Aunque los efectos benéficos en la salud de los individuos podían ser sólo inferidas, los resultados en prevención sí fueron evidentes en la salud de la comunidad. (32)

El consumo de leches fermentadas en diferentes formas ha continuado hasta la fecha. Actualmente se les llama yoghurt y han sido hechos de cultivos puros de cepas de *Lactobacillus bulgaricus*. El *Lactobacillus* que es el responsable de la fermentación del yoghurt es el ahora llamado *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* que actúa en unión con el *Sreptococcus salivarius subsp termophilus*.(44)

La primera guerra mundial y la muerte de Metchnikoff marcaron una declinación en el interés por el yoghurt. Después de la guerra (1920) resurgió la atención por el *L. acidophilus* en los suplementos alimenticios. Rettger et al y Yale (1935) demostraron que los "Bacilos Bulgáricos" no podían sobrevivir en el intestino humano y ellos usaron, en lugar de estos al *L. acidophilus*.

Después de la segunda guerra mundial el interés en la flora intestinal fue retomado gracias a dos factores:

a) El descubrimiento de los antibióticos que causaban algunas enfermedades por su modo de acción, lo que trajo como

consecuencia tratar de definir como estaba la composición de la flora intestinal, que era dañada por dichos antibióticos. (5)

b) La mejora de técnicas para obtener animales libres de gérmenes han recordado que la microflora intestinal puede también hacer una contribución positiva en la nutrición de su huésped, por ejemplo en la producción de vitaminas y la digestión. (44)

Una de las más convincentes demostraciones del rol de la microflora intestinal en la resistencia a enfermedades fue proporcionada por Carter y Collins en 1978. Ellos demostraron que conejos libres de gérmenes murieron con 10 células de *Salmonella enteritidis*, pero en animales convencionales con una flora intestinal completa, se requirieron 109 células para que murieran.

Los animales que tienen en su intestino una población normal de microorganismos son protegidos por éstos de ser atacados por enfermedades. Los animales jóvenes rápidamente adquieren una flora intestinal proveniente de su madre y del medio ambiente. Sin embargo, los métodos modernos de crianza limitan el contacto con la madre y proporcionan alimentos artificiales y condiciones ambientales antinaturales. El resultado es que la microflora intestinal es deficiente en algunos de sus componentes normales que son responsables de la resistencia a enfermedades. También la flora del adulto puede ser afectada por la dieta, por drogas antibacterianas y por

estrés. Por todo esto es recomendable el uso de Probióticos que van a contribuir a la restauración de la microflora intestinal.(49).

1.1.2 LA COMPOSICION DE LOS PROBIOTICOS.

La palabra original usada por Metchnikoff y sus colegas fué "Bacilos Bulgáricos" que seguramente se refería a los lactobacilos que formaban el yoghurt (*L. delbreuckii subsp. bulgaricus*), hoy en día los lactobacilos son los organismos más frecuentemente utilizados en los probióticos. EL *L. acidophilus* es utilizado con mayor frecuencia porque se cree que es el lactobacilo predominante en el intestino.(22)

Frecuentemente la preparaciones de probióticos contienen *L. delbreuckii subsp. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. cellobiosus*, *L. lactis*, y *L. reuteri*.(21)

El uso de estreptococos por primera vez fué en la preparación de leche y yoghurt. El *S. salivarius subsp. thermophilus* es un organismo común de los probióticos. También ha sido aislado del intestino el *Enterococcus faecium* (M74 y SF68), son también usados en preparaciones para animales. Otras especies de estreptococos utilizadas en probióticos son: *St. lactis*, *St. cremoris*, *St. diacetylactis* y *St. intermedius*.

Los probióticos también puede contener bacterias como *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium* y *Bacillus*.

Levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida pintolopesii* y hongos como *Aspergillus niger* y *A. oryzae*.(34)

1.2 INTERACCIONES BACTERIANAS EN EL INTESTINO.

Las interacciones microbiales representan una de las más importantes contribuciones a la homeostasis de la flora bacteriana en el intestino. La flora forma un ecosistema con su huésped, comprendiendo:

a) Componentes bióticos microorganismos indígenas, transitorios y las células del epitelio gastrointestinal.

b) Componentes abióticos de origen alimenticio.

c) Componentes endógenos, provenientes de secreciones o excreciones salivales, gástricas, pancreáticas y hepáticas. Incluyen enzimas, hormonas, mucosa, sales biliares, urea, inmunoglobulinas, péptidos y probablemente otros componentes no conocidos. Todos estos componentes interactúan y el resultado de estas interacciones es compatible con la supervivencia del huésped. Cuando ocurren desórdenes gastrointestinales el ecosistema puede llegar a desestabilizarse.(42)

1.2.1 METODOS PARA EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES BACTERIANAS

El primero de los métodos es explorar directamente

en el intestino del animal. Así se ha concluido que los *Lactobacilos* actúan dentro del intestino inhibiendo el crecimiento de enterobacterias, parte de su habilidad es la producción de ácido láctico L y D o L, D procedente de azúcares fermentables. Esto es válido en cultivos, pero es una conclusión errónea en el intestino por dos razones:

1) Estan presentes en muestras comerciales, pero en el intestino estan en menores concentraciones y son absorbidos.

2) Cuando el ácido láctico esta en el colon, es absorbido a través de la mucosa intestinal, situación que no se presenta en los cultivos en tubo.

El segundo método CFC (Cultivo de flujo continuo), descrito por Preter et al (1983). Es el más valido, porque la transición de componentes abióticos puede ser comparable con lo que ocurre en el intestino. Este método ha sido muy importante para el estudio de algunas interacciones bacteriales.

El tercer método es el usado en animales gnotobióticos, es decir animales libres de gérmenes son inoculados con cepas bacterianas conocidas y se han estudiado las interacciones bacterianas en diferentes porciones del intestino después del sacrificio de los animales.(42)

Los resultados obtenidos con los modelos de poliasociaciones han sido sometidos a una crítica evaluación, porque los componentes endógenos y los parámetros fisiológicos

pueden diferir de una especie a otra. Los animales gnotobióticos pueden ser usados más efectivamente administrándoles la flora de un animal convencional y comparando las interacciones bacterianas en el donador y el receptor.(42)

1.2.2 TIPOS DE INTERACCIONES BACTERIANAS EN EL INTESTINO.

La naturaleza de las interacciones bacterianas puede ser de antagonismo o de sinergismo. Pueden afectar el nivel de la población de las diversas cepas bacterianas o la actividad metabólica de éstas. Una adición por transferencia genética puede ocurrir entre cepas dentro del intestino. El huésped y la dieta pueden modular la expresión de las interacciones bacterianas.(42)

1.2.3 INTERACCIONES BACTERIANAS QUE AFECTAN LOS NIVELES DE VARIAS CEPAS BACTERIANAS EN EL INTESTINO.

Si una cepa bacteriana es ingerida por un huésped convencional, puede o no ser estabilizado, con un bajo o alto nivel de población o bien ser eliminada. Cuando no ha ocurrido una interacción bacteriana, los restos de las cepas están a un nivel estable por todo el período experimental. Cuando la interacción bacteriana lleva a la eliminación de las cepas, es usualmente dentro de una bacteriostasis. Ocasionalmente bacterias son sometidas a interacciones bactericidas, ya que muy

pocos organismos pueden ser contadas en las primeras horas post-inoculación. (6)

1.2.4 ANTAGONISMOS BACTERIALES.

Estas interacciones representan las muchas funciones atribuidas a las bacterias indígenas predominantes. Ellas protegen al huésped contra la proliferación de bacterias alimenticias y de bacterias potencialmente patógenas, que pueden producir tóxicas cuando ellas crecen en el interior del intestino, como es el caso de muchas cepas de bacterias toxigénicas de *Clostridium*, Enterobacterias, o *Campylobacter*. Algunas cepas toxigénicas pueden escapar al efecto barrera, cuando éstas se adhieren a las células de la mucosa de las paredes del estómago, o del intestino delgado (enterobacterias). (1)

El efecto barrera es extremadamente eficiente para prevenir infecciones, pero su expresión puede ser modificada por factores externos. Terapias con antibióticos pueden destruirlo y causar dramáticos desórdenes intestinales. La dieta también puede dirigir una eliminación de las bacterias indígenas predominantes. El efecto barrera es también el responsable de mantener algunas bacterias en niveles bajos. Cuando la homeostasis del intestino es lograda, un número menor de especies de bacterias es predominante. Poblaciones menores de 10^7 g⁻¹ de bacterias potencialmente patógenas como es *Clostridium* o enterobacterias son bien toleradas por el huésped. No obstante, cuando los factores medioambientales (dieta,

estrés, etc.) causan un disturbio en el intestino, dichas cepas pueden expresar su toxigenicidad. Hay ocasiones en que números comprendidos entre 10^7 y 5×10^8 g⁻¹ pueden o no expresar su toxigenicidad.(42)

1.2.5 SINERGISMO BACTERIANO

Las interacciones bacterianas afectan los niveles de población, pueden también incluir fuerzas sinérgicas. Ducluzeau et al (1977) mostraron que la *E. coli* al actuar con cepas de *Clostridium* ejercían un efecto antagónico contra *Sh. flexneri* y *C. perfringens*.

El sinergismo bacteriano puede también conducir a un incremento en el desorden patológico. Es probable que sinergismos bacteriales similares puedan ser responsables del establecimiento secuencial de la bacteria en el intestino de animales convencionales.(10)

Las cepas "pioneras" permiten la estabilización de otras bacterias ya que limpian el intestino de componentes inhibitorios del crecimiento de éstas, disminuyen el potencial REDOX de dicho órgano a un nivel compatible con el desarrollo de bacterias anaerobias estrictas susceptibles al oxígeno, además producen promotores del crecimiento que pueden ser responsables del establecimiento de cepas subsecuentes.(42)

1.2.6 LAS INTERACCIONES BACTERIANAS AFECTANDO LAS

ACTIVIDADES METABOLICAS.

Las interacciones bacterianas no sólo afectan los niveles de población en el intestino, si no que también afectan en un incremento o decremento del metabolismo bacteriano. (48)

Duval-Iflah et al (1983) observaron en cerdos gnotobióticos dosificados con una cepa no toxigénica de *E. coli* que protegía al cerdo contra una cepa de *E. coli* toxigénica sin causar una disminución en los niveles poblacionales de la cepa toxigénica.

Es probable que el sinergismo entre varias cepas bacterianas sea también requerido para una completa estimulación del sistema inmune intestinal del huésped. Moreau et al. (1982) demostraron que las células del plasma que sintetizan IgA fueron 10 veces menos abundantes en ratones adultos libres de gérmenes que en ratones convencionales. Los primeros dosificados con la flora intestinal completa de ratones convencionales de 7-23 días de edad fueron parcialmente estimulados en el sistema inmune, mientras que esta dosis con la flora intestinal de ratones de 25 días fueron completamente estimulados. Esto sugiere que en el efecto del sinergismo bacteriano están involucrados con el sistema inmune y flora intestinal. (22)

1.2.7 LAS INTERACCIONES BACTERIANAS RESULTAN EN UNA TRANSFERENCIA DE GENES.

La expresión de genes bacterianos en el intestino puede ser modificada por factores ambientales. Pero la transferencia de genes puede también ocurrir entre especies de bacterias dentro del intestino. Duval-Iflah et al (1981) demostraron que varias transferencias por conjugación entre cepas correspondientes a diferentes especies.

1.3 INTERACCIONES METABOLICAS EN EL INTESTINO.

Uno de los más importantes medios por los cuales un organismo probiótico puede ejercer un efecto benéfico en su huésped es el modificar los procesos metabólicos, particularmente los que ocurren en el intestino. Estos efectos pueden ser logrados en teoría por una variedad de mecanismos:

1.- Por reacciones de supresión de células que podrían producir toxinas o metabólitos carcinogénicos.

2.- Por reacciones de estimulación enzimática involucradas en la detoxificación de sustancias potencialmente tóxicas.

3.- Proporcionando al huésped enzimas involucradas en la digestión de nutrientes complejos, cuando están ausentes (por falla genética o enfermedad).

4.- Por síntesis de vitaminas y otros nutrientes esenciales no proporcionados en cantidades suficientes en la dieta. (46)

Estas reacciones metabólicas que ocurren en el intestino pueden tener consecuencias localmente (por ejemplo, en la mucosa de éste) o sistemáticamente. Un ejemplo de una consecuencia remota de

un metabolito producido en el intestino es la generación por bacterias intestinales de aminos y fenoles a partir de aminoácidos, los cuales pueden tener efecto en el sistema nervioso, el sistema vascular y potencialmente en tumores en varios órganos del cuerpo (47).

Posibles mecanismos de interacción de los probióticos con el metabolismo de las bacterias en el intestino.

1.-Los probióticos desplazan o disminuyen los organismos de la flora normal del intestino los cuales activan la ingestión de sustancias tóxicas o derivados carcinogénicos.

2.-Los probióticos proveen enzimas las cuales detoxifican sustancias ingeridas o su actividad metabólica.

3.-Los probióticos generan condiciones en el intestino, las cuales alteran la velocidad de la activación bacteriana al ingerir sustancias químicas, por ejemplo bajando el pH al afectar el metabolismo de la producción de amonio y ácido biliares.(4)

1.4 LA FLORA INTESTINAL Y LA RESISTENCIA A ENFERMEDADES

Ahora es reconocido que la microflora indígena de humanos y animales proporciona protección contra infecciones de microorganismos patógenos. La evidencia de una protección por la flora intestinal en gran parte por estudios con animales experimentales libres de gérmenes o tratados con antibióticos que son mucho más susceptibles a infecciones con patógenos intestinales que animales convencionales con una flora intestinal.(27)

1.4.1 RESISTENCIA A LA COLONIZACION

La protección contra la colonización del tracto intestinal por bacterias potencialmente patógenas proporcionada por la microflora intestinal fué llamado resistencia a la colonización por van Der Waaij et al. (1971).

Thijm and van Der Waaij (1979) examinaron, en unión. el efecto de antibióticos usados comúnmente en la resistencia a la colonización en el tracto digestivo de ratones. La administración de ampicilina administrada oralmente en varias dosis disminuyeron fuertemente la resistencia a la colonización contra una cepa resistente al antibiótico de *Escherichia coli*, de la cual se obtuvieron poblaciones entre 10^8 y 10^{10} organismos viables por gramo de heces. Por otro lado, la administración oral de cefradina, la cual es también absorbida, no tuvo efecto en la resistencia a la colonización. Las diferencias en el impacto de los antibióticos en la resistencia a la colonización fueron explicadas en el hecho en que la ampicilina y la epicilina, son excretadas en la bilis, presumiblemente llega al intestino en concentraciones suficientes para inhibir a las bacterias sensibles. En el caso de la cefradina, no es excretada en la bilis y por lo tanto no llega al tracto intestinal.

1.4.2 SUPRESION DE LA MULTIPLICACION DE PATOGENOS POR EL EFECTO DE LA FLORA INTESTINAL.

Hay evidencia de que la flora intestinal proporciona protección contra la colonización de patógenos entéricos. En los cuales estan incluidos los *Costridium difficile* y *C. botulinum*, las bacterias entéricas como *E. coli* *Salmonella*, *Shigella* y *Pseudomonas*, así como la levadura *Candida albicans*. (27)

1.4.3 MECANISMOS RESPONSABLES DE LA SUPRESION DE PATOGENOS

Cuando se altera la flora intestinal en animales experimentales y se emplean antibióticos se vuelven muy susceptibles a la colonización con patógenos y otros organismos no indígenas, pero cuando la flora no tiene disturbios esta ofrece resistencia a los patógenos. Un número de actividades de la flora intestinal han sido propuestos como mecanismos responsables de la exclusión de los organismos no indígenas. Incluyen la competencia por:

- 1) Nutrientes en cantidades limitadas,
- 2) Por la asociación a sitios en la mucosa intestinal.
- 3) La liberación de metabolitos por la flora indígena que inhiben el crecimiento de microorganismos y también estabilizan las condiciones intestinales. (27)

A) COMPETICION POR NUTRIENTES

La hipótesis de que la competencia de nutrientes es responsable de la exclusión de organismos no indígenas del tracto intestinal es basado en una serie de observaciones experimentales aunque no son concluyentes ya que Freter et al. (1983a) demostraron que la multiplicación de *E. coli*, *Fusobacterium sp.* y *Eubacterium sp.* fueron suprimidos cuando los organismos eran inoculados individualmente dentro de filtrados de cultivos de la flora del intestino grueso. Kennedy et al. (1988) mostraron sin embargo que la competencia por nutrientes no fué responsable de la inhibición de *C. albicans* en cultivos de flora del intestino grueso de ratones o de flora fecal humana. Para determinar si la inhibición fué debido a la competencia por nutrientes, agregaron a los filtrados compuestos de carbono, nitrógeno, vitaminas además de trazas de elementos. La multiplicación de *C. albicans* fué favorecida después de esta adición, sugiriendo que algunos otros mecanismos inhibitorios estuvieron participando, quizá por la producción de metabolitos tóxicos por componentes de la flora intestinal. (22).

B) METABOLITOS TOXICOS Y CONDICIONES AMBIENTALES ADVERSAS

Es considerado como evidencia que los metabolitos toxicos, incluyendo ácido sulfhídrico, ácidos biliares libres y cadenas cortas de ácidos grasos volátiles (VFA) son inhibidores de

bacterias intestinales. El ácido sulfhídrico contribuye a la supresión de la multiplicación de *E. coli* en los sistemas de cultivo continuo. Se tienen datos muy limitados de la actividad inhibitoria de ácidos biliares libres pero extensos resultados sobre la participación de VPA en la exclusión de patógenos del tracto intestinal. Sin embargo las poblaciones de *E. coli* no son influenciadas por concentraciones de VFA en el intestino. Las concentraciones de dichos ácidos asociados con la flora del intestino de ratones no están correlacionados con los niveles de población de cepas de *E. coli*, indicando que los ácidos no son los únicos agentes que regulan las poblaciones de *E. coli* en el intestino. Los VFAs afectan el nivel de pH del tracto intestinal representando una barrera a la colonización de la región por patógenos entéricos gram negativos. (17,27)

C) COMPETENCIA POR LOS SITIOS ACTIVOS

Algunos procesos infecciosos dependen de la perseverancia de los agentes patógenos en el tracto intestinal. Por lo tanto, como consecuencia de la actividad inhibitoria de la flora, el tiempo que permanecen los patógenos en el tracto intraluminal se duplica y se diluye en el líquido intestinal, y bajo estas condiciones los patógenos son teóricamente "lavados hacia fuera" de el tracto intestinal. Para asegurar la supervivencia en estas condiciones es importante para los patógenos el asociarse con la mucosa intestinal. (18)

1.5 SELECCION DE CEPAS PARA EL USO DE PROBIOTICOS

No se conoce precisamente que especies de cepas de microorganismos juegan un papel crucial en las propiedades benéficas de la flora intestinal. Además la naturaleza benéfica de la microflora indígena son proporcionados por varios microorganismos. Para animales de granja las más importantes características son:

- Promoción del crecimiento.
- Mejorar la conversión del alimento
- Alta prevención de disturbios intestinales, especialmente en animales jóvenes.
- Predigestión de factores antinutricionales.(26)

1.5.1 PRIMER PASO EN LA SELECCION DE CEPAS BACTERIANAS

Las bacterias que representativamente pueden ser usadas para un probiótico como seguras son: *Lactobacillus spp*, algunas *Bifidobacterias* y *Streptococos (Enterococcus) spp*. El uso de otros microorganismos es muy problemático pues hay que realizarles estudios de toxicidad que son muy costosos y consumen tiempo. Es importante también considerar en el proceso de selección el origen de la cepa. La selección esta determinada por el propósito específico del probiótico. Si la colonización de la cepa es una característica esencial en la aplicación del producto, especies con específica adición juegan un papel muy importante. En este caso

éste puede ser un parámetro importante para seleccionar una cepa proveniente de las especies huésped. Es importante también que esta cepa sea aislada del mismo órgano al cual se quiere que colonice. (26)

1.5.2 LAS ESPECIES Y LA VIABILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS PARA PROBIOTICOS

Por definición un probiótico contiene microorganismos viables, sin embargo, esto no excluye a los productos no viables que pueden tener también una fuerte actividad. Los probióticos comerciales contienen además de bacterias viables, una serie de productos que provienen de cultivos de microorganismos. (25)

Aunque todos estos productos indican que contienen *Lactobacillus acidophilus* vivos, menos de la mitad los presentan viables. Sólo la leche y los productos farmacéuticos contienen *L. acidophilus* en altas cantidades. De todos los productos obtenidos de tiendas de alimentos naturales y de suplementos alimenticios, solo un producto contuvo *L. acidophilus*, pero en bajas cantidades. Bajo condiciones desfavorables, la viabilidad de los microorganismos declina rápidamente. (25)

1.5.3 RESISTENCIA A CONDICIONES "IN VIVO"

Después de la administración del probiótico los microorganismos puede ser que no mueran por los mecanismos de

defensa del huésped. Dependiendo del sitio de administración, ellos pueden ser resistentes a las condiciones específicas. Por ejemplo, los probióticos de administración oral deben ser resistentes a las enzimas de la cavidad oral, a las enzimas y al bajo pH en el estómago, así como a la concentración de bilis de jugo pancreático y a la mucosa en el intestino delgado. *Lactobacillus* y *Streptococcus* son más resistentes a la lisozima que otras bacterias Gram positivas. A su vez las bacterias ácido lácticas son consideradas como tolerantes al ácido. Para seleccionar a las cepas de las bacterias que se van a utilizar en un probiótico las cuales tengan una actividad metabólica, multiplicación o colonización en el intestino para una óptima actividad en el probiótico, un criterio esencial de selección es la tolerancia a la bilis. También las colonias y la morfología son parámetros que nos permiten seleccionar a las cepas de *Lactobacillus*. (7)

1.5.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Cuando un probiótico es usado para disminuir el potencial patógeno u otras características desfavorables de los microorganismos en el huésped, esto puede ser benéfico si las cepas contienen propiedades antagonistas. Las bacterias ácido lácticas, que son frecuentemente utilizadas en los probióticos, poseen propiedades antagonistas que operan con:

- Decremento del pH por la producción de ácido láctico
- Consumo de nutrientes disponibles

- Decremento del potencial REDOX
- Producción de peróxido de hidrógeno (en condiciones anaeróbicas)
- Producción de componentes inhibitorios específicos, como las bacteriocinas. (26)

Por definición las bacteriocinas son de una naturaleza proteica y tienen un efecto bactericida con un estrecho espectro inhibitorio; éstas son sólo activas contra organismos que están relativamente cerca. (32)

1.6 PROBIOTICOS PARA CERDOS

Los disturbios intestinales tales como las diarreas, contribuyen significativamente a un decremento en la salud de los cerdos. Medicamentos como los antibióticos y quimioterapéuticos han sido usados con éxito contra los agentes bacterianos causantes de diarrea. (52)

Los probióticos pueden tener el potencial para ser parte del tratamiento y un buen agente profiláctico. Sin embargo, como las causas de los disturbios digestivos son multifactoriales, no se puede esperar que un solo tratamiento sea efectivo contra todos los agentes causales. El uso de probióticos no es exclusivo de otras alternativas y puede ser complementado y más efectivo. (9)

1.6.1 TRACTO DIGESTIVO

Sí las preparaciones de probióticos son duraderas y activas en el tracto digestivo, es porque resisten las condiciones ambientales del huésped y los mecanismos de protección que inhiben a los microorganismos. En el duodeno, la defensa más importante es la rapidez con la que corre el flujo intestinal además del poco tiempo que este permanece en contacto con el epitelio intestinal, esto implica que muy pocos microorganismos puedan adherirse a los sitios de dicho epitelio. (9)

La presencia de bilis en la región es también una influencia negativa para la actividad de los microorganismos patógenos. En el yeyuno e ileón tienen también un tránsito rápido lo que impide la adhesión de los microorganismos a la mucosa intestinal. En el ciego y en el intestino grueso la velocidad disminuye y los microorganismos pueden ser estabilizados, sin embargo, estos pueden competir con la flora indígena estable de animales sanos. (29)

1.6.2 BACTERIAS INDIGENAS ACIDO LACTICAS.

Los cerdos son animales monogástricos, su intestino delgado es colonizado por una flora relativamente rica, en la cual predominan las bacterias ácido lácticas (LAB), principalmente *Lactobacillus* y *Streptococcus spp.* Estas son ingerida en el

alimento y son sujetadas en el epitelio. (19)

Las bacterias ácido lácticas tiene un papel fisiológico, microbiológico importante en las funciones digestivas. Esto ayuda al lechón a mantener el pH del estómago bajo por la producción de ácido láctico y otros ácidos orgánicos formados por la actividad de la lactosa sobre la leche de la cerda. LAB pueden regular la microflora del intestino delgado inoculando el alimento que pasa al tracto digestivo. Además las bacterias ácido lácticas pueden competir con otras bacterias y así reducir la contaminación del tracto digestivo inferior. (2,19)

Aunque el grupo de bacterias dominante asociadas con la mucosa duodenal es el de los *Lactobacillus* se ha reportado también a los *Bacteroides* y *Clostridium* como importantes a través del intestino delgado. Fuller y colaboradores (1978) han encontrado que *L. fermentum* es la más común de las especies aisladas (93%) en lechones de 2-10 días de edad.

Los lechones que han nacido en un ambiente convencional tendrán la flora normal de un adulto. La selección y estabilidad de la flora indígena en el recién nacido ocurre progresivamente desde su nacimiento. Ducluzeau (1985) han mostrado que el efecto de la leche de la cerda no es muy importante porque no hay un cambio importante en la composición de la flora digestiva que ocurra al destete, mientras que el calostro indiscutiblemente tiene un efecto protector contra la diarrea causada por bacterias Gram negativas porque la lisozima que se encuentra en la leche de la cerda tienen un efecto significativo contra la colonización bacteriana en el

intestino del lechón.

Los *Lactobacillus* en el tracto digestivo parecen ser más afectados que, por ejemplo, *E. coli*, por la falta de nutrientes. (9, 29)

1.6.3 EFICACIA DE LOS PROBIOTICOS

Las cepas usadas en los probióticos pueden variar en sus características y sus acciones por: la susceptibilidad del huésped puede variar de un estudio a otro. Cambiar las condiciones "IN VIVO" puede también alterar la actividad del probiótico en las células. (8)

La evaluación de el uso de probióticos "IN VIVO" incluye estudiar:

- Influencia en la flora digestiva, incluyendo bacterias patógenas.
- Influencia en el tracto digestivo, en función y morfología.
- Función en la salud de los animales. (9,29)

1.6.4 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MICROFLORA DIGESTIVA

La microflora es un sistema relativamente estable, pero también es dinámico. Las cepas pueden ser remplazadas por otras y el metabolismo al adaptarse provocará que los sustratos cambien también. La competición por nutrientes limitados es uno de los factores determinantes que más han sido evaluados. La adición de

pequeños números de bacterias o sus metabolitos pueden tener una substancial influencia en la microflora. Por supuesto que la composición de la dieta puede ser también de gran importancia. (17)

Se ha observado un decremento en los niveles de *E. coli* hemolítica en las heces de cerdos destetados que habían sido dosificados con *L.acidophilus*.

Cuando a lechones desafiados con *E. coli* se les administró un alimento con el producto de la fermentación por *Lactobacillus*, los animales mejoraron y el conteo de *E.coli* disminuyó considerablemente pero no el de *Lactobacillus* en el estómago (9). Ratcliffe et al (1986) encontraron que el yogurt y la leche fermentada con *L.reuteri* proporcionó a los lechones de 2 días de edad un incremento en el número de lactobacilos y un decremento en el número de *E.coli* en el intestino. Cuando la leche es acidificada con ácido láctico el número de bacterias coliformes y de lactobacilos decrece.

Para *Streptococcus* y *Ent. faecium*, ocurre un decremento en la excreción de bacterias coliformes y *E.coli*. Sin embargo, no previene contra la enfermedad. Usando una preparación que contenía *Ent. faecium*. Danek en 1986 (citado por Fuller 1992) observó que se influenciaba la flora fecal por un decremento en el número de bacterias coliformes, un incremento en la fermentación láctica y en la cuenta de estreptococos. Los *Ent. faecalis* son antagonistas de *Salmonella* y levaduras. (9,29)

1.6.5 FUNCION DE LAS BACTERIAS DE LOS PROBIOTICOS

Lactobacillus: Han sido reportados en muchos trabajos para mejorar el rendimiento y la salud. Puercos con diarreas crónicas han mostrado considerables mejorías después de la administración de cepas de *L.acidophilus*. (29)

No todas las cepas de *L. acidophilus* son idénticas y por lo tanto la variación puede dar resultados conflictivos. Un significativo mejoramiento en la ganancia de peso y un decremento en la incidencia de diarrea se notó en cerdos que recibieron una cepa de *L.fermentum* (43).

Streptococcus: En cerdos criados bajo subóptimas condiciones, al administrar esta bacteria se han observado mejoras en el rendimiento y en la salud de estos. Un incremento en el peso, en el consumo de alimentos y en la conversión de los mismos, esto se encontró cuando se dosificó a puercos de 4 meses con *Ent.faecium* C68. Decreció la incidencia de diarrea en lechones recién nacidos cuando fueron dosificados con esta cepa (39).

OTROS ORGANISMOS: Cuando el yogurt fué administrado en puercos de 2-12 días de edad se encontró un decremento del alimento consumido en función del peso ganado. Utilizando una cepa humana de *Bif. bifidum* se reportó un incidencia menor de las enfermedades en puercos lactantes y destetados después de ser dosificados (43).

1.6.6 TECNICAS PARA AISLAR LAS CEPAS

La técnica más común es usando el medio selectivo estandarizado por ejemplo el ROGOSA, para aislar microorganismos ácido lácticos indígenas del intestino y producir la especies más dominantes. (9,8)

La mayor parte de los reportes describen las características de las bacterias ácido lácticas porcinas, no pueden ser seleccionadas por el tipo de cambios en el medio, tiene que ser por la capacidad para adherirse a la mucosa intestinal o a la capacidad de producir metabolitos que inhiban la colonización de organismos patógenos.(8)

Los lactobacilos crecen mejor en condiciones de anaerobiosis; aunque también pueden crecer en presencia de oxígeno utilizando un metabolismo fermentativo. Dichas bacterias pueden presentar diversas morfologías coloniales, lo cual es importante porque las cepas aisladas producen colonias lisas que son más resistentes a los ácidos biliares y al congelarlas las cepas producen colonias rugosas. En contraste, estudios recientes han demostrado que cepas de *L. fermentum* de origen porcino con colonias rugosas son más resistentes a los ácidos biliares y al pH bajo que las cepas de colonias lisas. La morfología y fisiología de las cepas aisladas puede ser diferente de lo que previamente se ha considerado normal para los lactobacilos. La morfología de estas bacterias nativas pueden causar algunas veces confusión.(45)

2.0 JUSTIFICACION

Los cerdos son candidatos ideales para la administración de los probióticos, especialmente preparaciones que contengan bacterias ácido lácticas, por la gran cantidad de estos microorganismos que se encuentran en animales sanos. Muchos factores pueden influenciar la eficacia de estas preparaciones como podrían ser; genéticas, fisiológicas o el estado de salud del animal, así como la dieta, las condiciones del medio ambiente, etc. Aunque producen efectos benéficos en el crecimiento y en la salud del animal, no siempre puede ser demostrado, esto se presenta a menudo en cerdos recién nacidos, antes y después del destete. Por ejemplo la administración de probióticos elimina o disminuye los cuadros de diarrea crónicos que se presenta a estas edades. Los lechones son animales muy susceptibles a desarrollar diarreas siendo la *E. coli* la bacteria más frecuentemente involucrada. Actualmente existe, una tendencia a disminuir el uso de antibióticos por los efectos colaterales que traen, por eso se están desarrollando nuevos productos, que apoyen el control de diarreas, tales como los probióticos los cuales deben ser debidamente elaborados para que realmente se logre el objetivo, de aquí la necesidad de evaluar previamente a los microorganismos que puedan ser incluidos en él. (8,22)

3.0 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Valorar la interacción de *Streptococos* y *Lactobacilos* entéricos en el control del crecimiento y actividad enterotóxica del *Escherichia coli*.

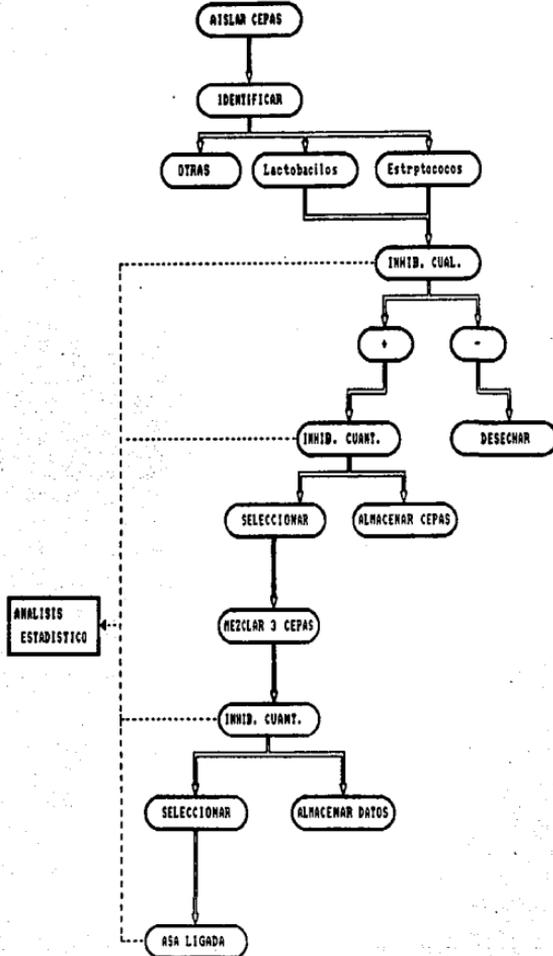
OBJETIVOS PARTICULARES:

Aislar cepas de *Lactobacilos* y *Streptococos* porcinos a partir de raspado intestinal.

Seleccionar las cepas de *Lactobacilos* y *Streptococos* en base a su capacidad de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, "IN VITRO".

Evaluar la interacción entre *Lactobacilos* y *Streptococos* en su actividad inhibitoria del crecimiento y actividad toxigénica de la *Escherichia coli* "IN VITRO" e "IN VIVO".

DIAGRAMA DE FLUJO



4.0 METODOLOGIA

4.1 AISLAMIENTO DE CEPAS.

1.-Se tomaron muestras de raspados intestinales de lechones procedentes de granjas con problemas diarréicos.

2.-Dichos raspados se sembraron por diución en cajas de agar agar ROGOSA (medio de cultivo especial para bacterias ácido lácticas).

3.-Se incubarán por 48 horas a 37 ° C en condiciones de anaerobiosis.

4.-Se resembraron por estrias las colonias que se presentaron en el cultivo anterior con el objetivo de purificarlas. Dichas resiembras se incubarán en las condiciones antes mencionadas.

4.2 IDENTIFICACION DE LAS CEPAS.

1.-Se realizó una tinción de Gram de todas las colonias resembradas en el punto anterior.

2.-Se seleccionaron las cepas que presentaron la morfología de bacilos. cocos y cocobacilos, a las cuales se les realizaron pruebas de catalasa y oxidasa.

4.3 INHIBICION CUALITATIVA POR GOTTA:

1.-Se sembraron las cepas de *Streptococcus spp* y

Lactobacilos spp aislados, en tubos de Medio ROGOSA en caldo y se incubaron a 37 ° C durante 48 hrs.

2.-Se sembró la *E. coli*, 24 horas antes de realizar la prueba, y se incubó a 37 ° C.

3.-Se estandarizó la *E. coli* a una densidad óptica de 0.4 de absorbancia 550 nm de longitud de onda. Posteriormente se colocó en un baño de hielo para detener su crecimiento.

4.- Las cepas problema fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos, para trabajar el sobrenadante y observar la capacidad inhibitoria de los metabolitos secundarios presentes en el medio, sobre el crecimiento de la *E. coli*.

5.-En las cajas con Muller Hilton se sembró la *E. coli* sobre la superficie del agar, a manera que abarcará toda el área de la caja, de la manera más uniformemente posible; finalmente se dejó secar.

6.-Sobre las cajas ya sembradas con *E. coli*, se colocó una gota del sobrenadante de cada una de las cepas que se estaban estudiando, identificándolas adecuadamente, en cada caja se colocaron de 3 a 4 gotas para facilitar la lectura y evitar que se mezclaran. Después se dejarón secar antes de ponerlas a incubar.

7.-Se incubaron las cajas de 2 a 4 horas según fué necesario a 37 ° C en la estufa.

8.-Después de dos horas de incubación se observaron las cajas cada media hora, a fin de detectar la presencia de los halos de inhibición del crecimiento de *E. coli*, que se formaban

cuando los metabolitos secundarios tenían actividad sobre la bacteria de prueba.

4.4 CUANTIFICACION DE LA INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE *Escherichia coli*.

1.-Se sembraron las cepas de *Streptococos* y *Lactobacilos*, que dieron positivas en la prueba anterior (para ahora cuantificar su actividad), se utilizó en este caso medio ROGOSA para sembrar a las bacterias y se dejó en incubación 48 horas.

2.-La *E. coli* se sembró 24 horas antes de realizar la prueba en caldo de BHI, y se incubó a 37° C.

3.-Se prepararon cajas de medio Mac Conkey, tubos de Solución salina fisiológica estéril con 4.5 ml para realizar las diluciones, y se esterilizaron las pipetas necesarias para efectuar la prueba.

4.-Después de la incubación de la *E.coli* se estandarizó a una densidad 0.2 de Absorbancia a 550 nm de Longitud de onda. Para posteriormente colocarla en baño de hielo para detener su crecimiento.

5.-En tubos estériles, se colocaron cantidades específicas de las diversas cepas a trabajar y de *E.coli* estandarizada en una relación de 2:1 respectivamente. Estos tubos se incubaron por 4 horas a 37 ° C.

6.-Después de la incubación, los tubos se retiraron de la estufa, y se colocaron en un baño de hielo, para como en los

casos anteriores evitar en lo más posible el crecimiento de las bacterias.

7.- A cada tubo se le realizaron diluciones decimales hasta 10^{-5} homogenizando perfectamente entre dilución y dilución.

8.-De las diluciones realizadas se sembraron por duplicado en cajas de MacConkey.

9.-Al mismo tiempo se corrió el control positivo que estuvo formado solamente por *E. coli* el cual se diluyó y sembró igualmente que en el caso de las muestras anteriores.

10.-Se realizó el conteo de las UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC), multiplicando por el inverso de la dilución empleada, y se compararon con el control positivo. Esto se repitió tres veces para sacar una media y realizar un análisis estadístico.

11.-Luego se eligieron dos *Lactobacilos* y un *Streptococo* que fueron los que presentaron una mayor actividad y se mezclaron en las siguientes proporciones:

<i>Lactobacillus</i>	<i>Estreptococos</i>
3	2
3	1
2	2
3	1
3	2
4	1

4.5 PRUEBA DE INHIBICION 'IN VIVO' (ASA LIGADA).

1.-Se incubaron las bacterias y se mezclaron en la proporción que dió mejor actividad inhibitoria del crecimiento de *E.coli* "IN VITRO".

2.-Los conejos que se operaron se dejaron sin alimento, pero si con agua 24 horas antes de realizar la operación.

3.-En este caso se utilizó el material previamente preparado para la cirugía.

4.-Se llenaron las jeringas con los volúmenes previamente establecidos de cada una de las bacterias, que fuero inoculadas en el intestino del animal.

5.-Cuando se operan conejos es necesario administrarles un antihistamínico y un antiadrenérgico, para disminuir así los efectos adversos del anestésico, y la probabilidad de muerte durante la operación.

6.-Se anestesiaron los animales con pentobarbital sódico, después se colocaron en la mesa de cirugía, se sujetaron de las

después se colocaron en la mesa de cirugía, se sujetaron de las patas, se rasuró el abdomen de los animales, se les administró Xilocaína en el lugar de la incisión, y se procedió a abrir el abdomen.

7.-Se localizó el yeyuno y se procedió a realizar las asas, inoculando la mezcla antes seleccionada. Fué necesario incorporar un control positivo y uno negativo.

8.-Después de la inoculación se suturó el vientre del animal y se dejó en observación durante 24 horas.

9.-Transcurridas las 24 horas a los animales que no habían muerto, se les sacrificaba, y de forma similar a los que murieron antes de dicho período de tiempo, se les volvió a abrir la incisión realizada y se median los volúmenes de las porciones del intestino inoculadas con cada cepa además de cada uno de los controles positivo y negativo.

10.-Se efectuó una corrección de los volúmenes registrados en cada una de las porciones, en base al control negativo, y se estableció cual fué el porcentaje de inhibición de acumulación de líquido de cada cepa.

5.0 RESULTADOS

De las 45 cepas aisladas del intestino que fueron seleccionadas por morfología colonial y tinción de Gram, sólo 18 presentaron halos de inhibición y fueron constantes.

RESULTADOS DE LA INHIBICION CUALITATIVA DEL CRECIMIENTO DE *Escherichia coli* POR LAS CEPAS EN ESTUDIO

TOTAL DE CEPAS	P O S I T I V A S		
	CONSTANTES	INCONSTANTES	NEGATIVAS
45	18	15	12

CUADRO 2

De las 18 cepas seleccionadas al cuantificar su inhibición "IN VITRO" el total de ellas mostró una inhibición estadísticamente significativa del crecimiento de la *E. coli* ($p < 0.0001$).

De las cepas estudiadas se seleccionaron tres que fueron idéntificadas como dos *Lactobacillus* y un *Streptococcus*.

En promedio se obtuvieron 1.43×10^8 ($\pm 3.9 \times 10^8$) UFC de la *E. coli* y 3.23×10^8 ($\pm 25.5 \times 10^8$) UFC de dicha bacteria en cultivo individual con cada una de las cepas. Datos mostrados en el cuadro 2. El estudio estadístico fué realizado en un análisis de varianza para un diseño completamente aleatorio.

La gráfica 1 nos muestra una comparación del promedio de los resultados obtenidos de cada cepa en ciclos logarítmicos con el resultado similar del control positivo de cada una, en el que se nota claramente la inhibición del crecimiento de la *E.coli* por las cepas analizadas.

Como podemos comprobar en la gráfica 2 la disminución de ciclos logarítmicos promedios por cepa se encuentra entre 0.77 y 2.11, esto nos muestra que las cepas analizadas realmente tienen una actividad inhibitoria del crecimiento de *E.coli* (Cuadro 4).

Los resultados obtenidos de las pruebas de la inhibición del crecimiento de la *E. coli* por las mezclas realizadas se encuentran en el cuadro 7 indicando además los datos de los controles positivos.

En la gráfica 3 se muestra claramente la diferencia entre los ciclos logarítmicos del *E.coli* y las mezclas realizadas con las cepas seleccionadas, en la que obtuvimos que el efecto inhibitorio se sigue manteniendo. La disminución de ciclos logarítmicos estuvo en un rango de 1.44 a 1.80. Observar cuadro 8

Mostrando un efecto inhibitorio estadísticamente significativo ($p < 0.000005$) de las mezclas con respecto al control positivo. Sin embargo no se presenta diferencia significativa entre la actividad de las mezclas entre sí, por lo que cualquier mezcla pudiera ser seleccionada para seguir las pruebas referentes a la estabilidad y actividad necesaria para pertenecer a un probiótico.

De dichas mezclas, puesto que no presentaron diferencia

significativa, se seleccionó la que presentó una mayor disminución de ciclos logarítmicos del crecimiento de *E. coli* que fué la mezcla número 5 con una proporción de 3:2 de *Lactobacillus* y *Streptococcus* respectivamente.

Al realizar las pruebas "IN VIVO" el efecto bloqueante de la toxina LT fué estadísticamente significativo ($p < 0.05$), (ver cuadro 9). En el promedio de todos estos datos se ve claramente la diferencia entre la acumulación de líquido de la mezcla, el control positivo y el control negativo.

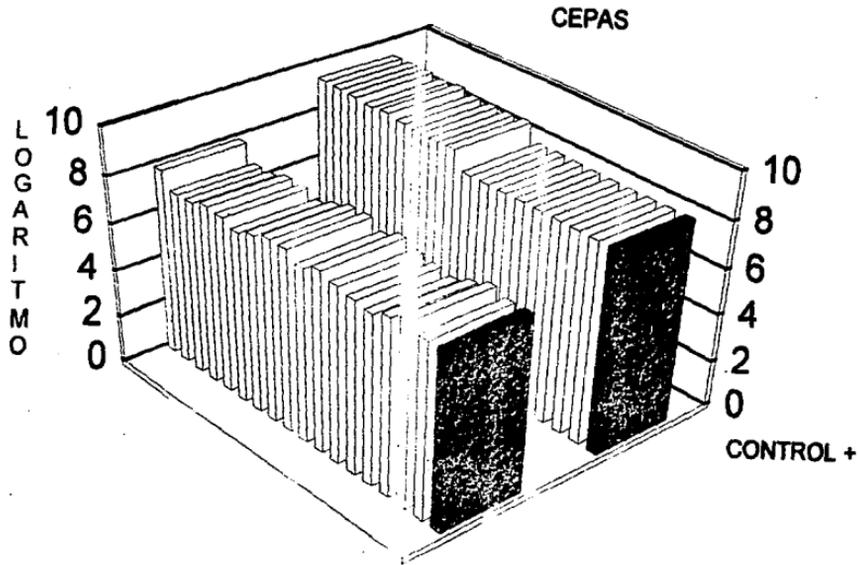
Al utilizar la *E. coli* productora de la toxina LT se obtuvo una reducción promedio del 60% (+/-12.9) de líquido acumulado en el asa.

PROMEDIO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE
INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE *Escherichia coli*
"IN VITRO" POR CADA CEPA EN ESTUDIO.

CEPA	UFC/ml	LOGARITMO	CONTROL (+)	LOG.
1	268.3X10 ⁵	7.93	22833.3X10 ⁵	9.36
2	183.0X10 ⁵	7.26	22833.3X10 ⁵	9.36
3	190.0X10 ⁵	7.28	22833.3X10 ⁵	9.36
4	313.3X10 ⁵	7.50	18633.7X10 ⁵	9.27
5	266.7X10 ⁵	7.43	22833.3X10 ⁵	9.36
6	151.7X10 ⁵	7.18	18666.7X10 ⁵	9.27
7	290.0X10 ⁵	7.46	16833.3X10 ⁵	9.23
8	515.0X10 ⁵	7.71	16833.3X10 ⁵	9.23
9	520.0X10 ⁵	7.72	18666.7X10 ⁵	9.27
10	223.3X10 ⁵	7.35	3933.3X10 ⁵	8.59
11	466.7X10 ⁵	7.67	3933.3X10 ⁵	8.59
12	268.3X10 ⁵	7.43	3933.3X10 ⁵	8.59
13	190.3X10 ⁵	7.28	3933.3X10 ⁵	8.59
14	140.3X10 ⁵	7.15	3933.3X10 ⁵	8.59
15	278.7X10 ⁵	7.45	3933.3X10 ⁵	8.59
16	539.0X10 ⁵	7.73	3933.3X10 ⁵	8.59
17	305.3X10 ⁵	7.48	3933.3X10 ⁵	8.59
18	315.7X10 ⁵	7.50	3933.3X10 ⁵	8.59

CUADRO No. 3 Resultados de la inhibición cuantitativa del crecimiento de *E. coli* por las cepas en estudio como podemos observar todas las cepas inhiben a dicha bacteria.

INHIBICIÓN CUANTITATIVA DE E. coli (LT) POR LAS CEPAS ESTUDIADAS



GRÁFICA 1

$P < 0.0003$

LOGARITMO DE LAS CEPAS

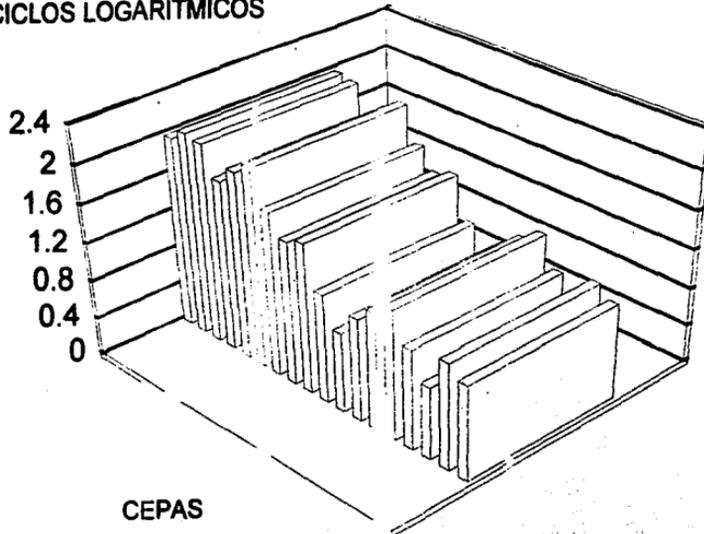
DISMINUCION DE CICLOS LOGARITMICOS
DEL CRECIMIENTO DE LA *Escherichia coli*
POR *Lactobacilos* y *Streptococos* LACTICOS

CEPA	PROMEDIO DEL LOGARITMO	PROMEDIO DEL CONTROL (+)	DIFERENCIA ENTRE AMBOS
1	7.36	9.35	1.99
2	7.24	9.35	2.11
3	7.27	9.35	2.08
4	7.47	9.25	1.78
5	7.40	9.35	1.95
6	7.18	9.25	2.07
7	7.44	9.15	1.71
8	7.65	9.15	1.50
9	7.68	9.25	1.57
10	7.36	8.50	1.14
11	7.67	8.50	0.83
12	7.43	8.50	1.07
13	7.27	8.50	1.23
14	7.14	8.50	1.36
15	7.45	8.50	1.05
16	7.73	8.50	0.77
17	7.38	8.50	1.12
18	7.50	8.50	1.00

CUADRO No.4 Observamos claramente la disminución en ciclos logarítmicos por las cepas en estudio con respecto a la *E. coli*.

DISMINUCIÓN DE CICLOS LOGARITMICOS DE E. coli

CICLOS LOGARITMICOS



GRÁFICA 2

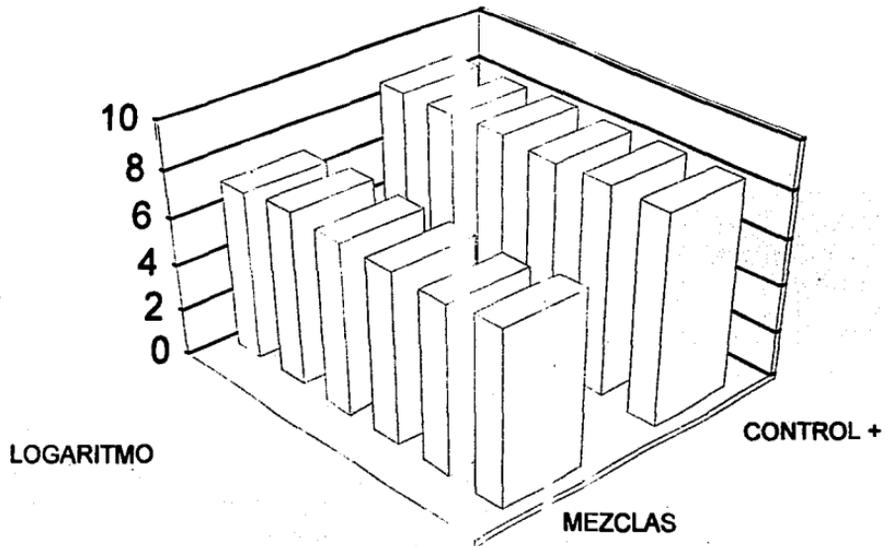
PALETA DE COLORES

PROMEDIO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN
LA INHIBICION "IN VITRO DEL CRECIMIENTO DE *Escherichia coli*
UTILIZANDO LAS MEZCLAS MENCIONADAS.

MEZCLA	UFC/ml	LOGARITMO	CONTROL(+)	LOGARITMO
1	141.7X10 ⁵	7.15	6333.3X10 ⁵	8.80
2	263.3X10 ⁵	7.42	6333.3X10 ⁵	8.80
3	195.0X10 ⁵	7.29	8333.3X10 ⁵	8.92
4	191.7X10 ⁵	7.28	6333.3X10 ⁵	8.80
5	140.0X10 ⁵	7.15	8333.3X10 ⁵	8.92
6	281.7X10 ⁵	7.45	8333.3X10 ⁵	8.92

CUADRO 5. Observamos claramente la diferencia entre los logaritmos de las mezclas realizadas y el crecimiento de *E. coli* donde observamos un notable efecto inhibitorio.

INHIBICIÓN CUANTITATIVA DE E. coli POR LAS MEZCLAS REALIZADAS



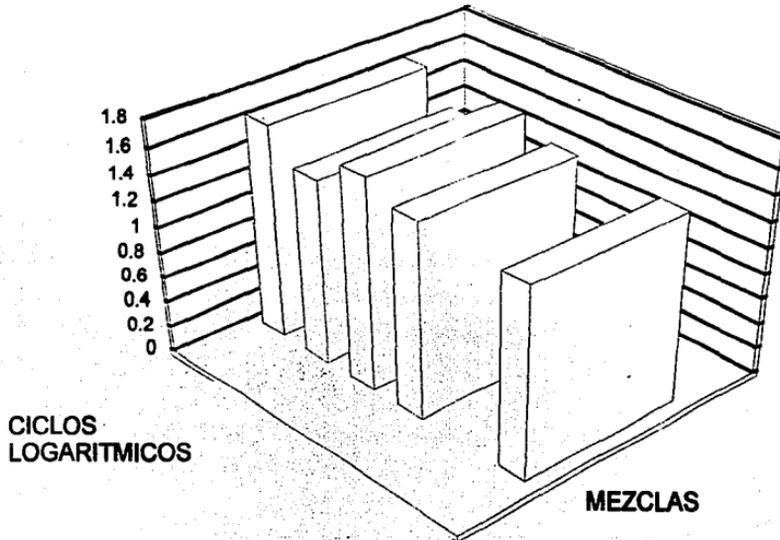
GRÁFICA 3

DIFERENCIA ENTRE LOS CICLOS LOGARITMICOS
DEL CRECIMIENTO DE LA *Escherichia coli* Y LAS MEZCLAS

MEZCLA	PROMEDIO DEL LOGARITMO	PROMEDIO DEL CONTROL(+)	DIFERENCIA ENTRE AMBOS
1	7.15	8.81	1.66
2	7.37	8.81	1.44
3	7.26	8.91	1.65
4	7.29	8.81	1.52
5	7.11	8.91	1.80
6	7.43	8.91	1.48

CUADRO No.6 Diferencia entre los logaritmos de las mezclas realizadas y el crecimiento de la *E. coli*.

DISMINUCIÓN DE CICLOS LOGARITMICOS DE E. coli POR LAS MEZCLAS REALIZADAS



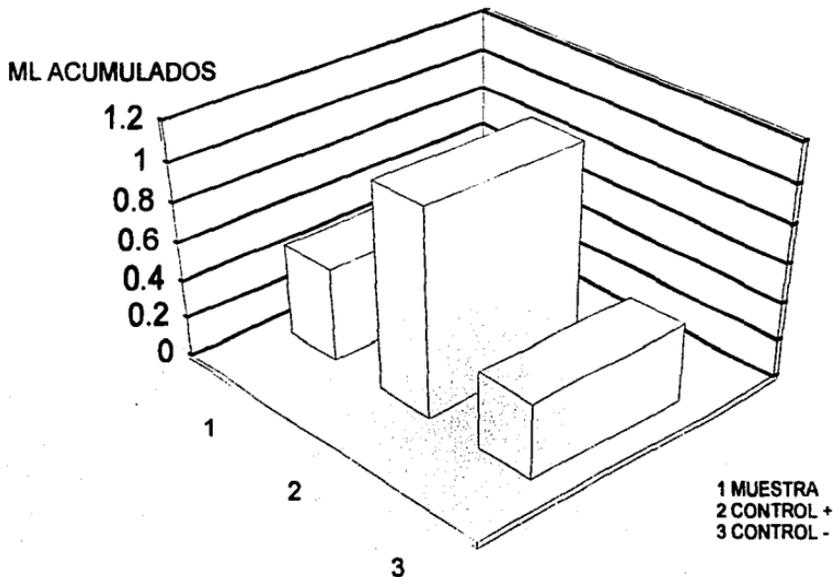
GRÁFICA 4

INHIBICION "IN VIVO" DEL CRECIMIENTO DE
Escherichia coli POR LA MEZCLA SELECCIONADA (ASA LIGADA).

CONJUNTO No	1	2	3	4	5	PROMEDIO
CONTROL +	1.1 ml	0.4 ml	0.5 ml	0.7 ml	2.5 ml	1.06 ml
MUESTRA	0.3 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	1.5 ml	0.48 ml
CONTROL -	0.3 ml	0.1 ml	0.2 ml	0.2 ml	1.2 ml	0.40 ml

CUADRO No. 7 Podemos observar la acción inhibitoria sobre la toxina LT de la *E. coli* por las mezclas en estudio, donde la inhibición que se presenta es del 87.87%

BLOQUEO DE LA ACCIÓN DE LA TOXINA LT DE E. coli



GRÁFICA 5 ML ACUMULADOS EN EL INTESTINO (MEZCLA 5)

6.0 DISCUSION

Las cepas requeridas para la producción de probióticos porcinos son preferencialmente bacterias ácido lácticas, (44,22) las bacterias que se seleccionaron para la realización de este trabajo fueron todas pertenecientes a este grupo.

Estas cepas fueron aisladas por medio de un raspado intestinal porcino con la finalidad de obtener bacterias específicas de esa especie, esto nos evitó tener que realizar algunas pruebas que hubiesen sido muy costosas y tardadas para identificarlas y corroborar su efectividad, además de que nos facilitó el proceso de selección, lo anterior de acuerdo con Ratcliffe et al (1986) que dicen que son más eficientes los resultados si se obtienen cepas específicas de especie. (43)

Como primer paso se seleccionaron las bacterias en base a su capacidad inhibitoria del crecimiento de la *E. coli* enterotoxigénica en forma cualitativa "*IN VITRO*". La importancia de esta propiedad es que ésta es responsable de severas pérdidas a la porcicultura por causar la muerte por diarrea en lechones de menos de 1 mes de vida (9,22,29,52,).

Posteriormente se realizaron pruebas de inhibición cuantitativa con lo que se pudo observar que todas las cepas tenían estadísticamente el mismo efecto y podían ser seleccionadas cualesquiera de ellas para continuar con la siguiente fase del

trabajo, donde se realizaron diferentes mezclas en las proporciones citadas en el cuadro 1, las que fueron tratadas de la misma forma que cada una de las cepas. Al no haber diferencias significativas entre las mezclas se eligió la que se considero más adecuada por las proporciones de *Lactobacillus* y *Streptococos* que contenían (3:2). (22)

La inhibición del crecimiento de *E. coli* que presentaron las mezclas disminuyo un poco con respecto a los resultados obtenidos con las cepas solas. Y pudo deberse a que presentaron cierto grado de antagonismo entre ellas. (42)

En cuanto a los resultados de las pruebas "IN VIVO" se puede detectar un claro efecto bloqueador de la actividad de la toxina LT en el tracto intestinal lo que ocasiona una considerable disminución en el volumen del líquido intestinal acumulado en las asas ligadas siendo en ocasiones muy similar al del control negativo, lo anterior está de acuerdo con lo que Havenaar (1992) afirma, se puede detoxificar la toxina o bloquear receptores e impedir su adhesión al intestino. (18,26)

Cabe mencionar que algunas de las cepas trabajadas con el transcurso del tiempo perdieron dicha actividad por lo que fueron descartadas. Esto nos hace recalcar la importancia de estar corroborando la constancia en la estabilidad de la actividad inhibitoria de las cepas que finalmente pueden ser seleccionadas para la elaboración de un probiótico. Como lo sugieren Rowland, Fuller, Parker entre otros en sus trabajos citados en la introducción. (47,22,38)

La inhibición cualitativa por gota nos da una muestra clara de la actividad de las bacterias, lo que nos facilita la previa selección de éstas.

Las bacterias ácido lácticas que se seleccionaron por la producción de sustancias antagónicas pueden ser empleadas como cepas para la producción de probióticos, pero algunas consideraciones tienen que tomarse en cuenta: "IN VIVO": la producción del agente antimicrobiano puede bajar o inactivarse, o algunos organismos pueden ser resistentes a los agentes antimicrobianos. Como lo reporta Alvarez (1993).

Como ya se mencionó las interacciones bacterianas involucran múltiples mecanismos. Estos pueden diferir de acuerdo con las especies de los huéspedes individuales y de la localización de las poblaciones bacterianas en el intestino.(4)

La dieta y quizá otros factores del ambiente, como el estrés, pueden modificar esta expresión. Estos mecanismos pueden ser demostrados "IN VIVO". (1,42,49)

Algunas interacciones bacterianas involucran sinergismo entre más de una especie predominante (42). Por lo que el número de combinaciones posible puede resultar muy alto, para poderlo determinar en este trabajo.

Lo que es importante mencionar es la necesidad de considerar a varias cepas para la elaboración de un probiótico, ya que la flora normal del intestino no está formada por una sola cepa o una sola especie, sino por una interacción de ellas, las que se controlan y estabilizan en condiciones normales (1,4,27,22,).

además de que esta biodiversidad contribuye a la regulación y control de las cepas de microorganismos que puedan afectar la estabilidad de dicho órgano (4,13,26,27).

Las tres cepas seleccionadas se mezclaron en las proporciones indicadas en el cuadro 1, para comprobar así su interacción en la acción inhibitoria del crecimiento de *E. coli*.

Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la actividad entre las cepas frente a *E. coli*, la estabilidad y el espectro antibacteriano de las mismas varía, por esto es necesario establecer el comportamiento óptimo de las bacterias que van a formar parte del probiótico.

7.0 CONCLUSIONES

Las cepas valoradas en este trabajo poseen las características básicas necesarias para poder controlar las diarreas en los lechones causadas por *E. coli* durante la primera semana de vida.

En las pruebas realizadas en el laboratorio todas las cepas mostraron tener buena actividad inhibitoria del crecimiento de la *E. coli*.

En la práctica los probióticos pueden ser empleados para obtener diversos beneficios, como pueden ser: una mejor nutrición en los animales, los lechones tendrían un crecimiento más rápido entre otros, las condiciones de equilibrio en la salud de los animales son más factibles a conservarse con la administración de este producto.

Se considera a los probióticos mejor opción para la prevención de la diarrea que los antibióticos, ya que no agreden las condiciones óptimas del intestino y no causan una disminución en el peso de los animales, así como también se ha demostrado que contribuyen a una mejor absorción de los nutrientes y todo esto se manifiesta como una mayor resistencia a las bacterias patógenas.

Tanto las cepas individuales como las mezclas estudiadas en este trabajo pueden ser incluidas en un probiótico ya que cumplen con las características que se reporta para esto.

Los cerdos son animales ideales para que se les administren probióticos, ya que su microflora intestinal está ampliamente compuesta por bacterias ácido lácticas, además de que los lechones son víctimas de graves infecciones causadas por bacterias enterotoxigénicas en las primeras semanas de vida y éstas pueden incluso causarles la muerte, se considera que la administración de bacterias ácido lácticas, podrían apoyar los programas de control de las diarreas en las granjas porcícolas.

Al controlar los cuadros de esta enfermedad las pérdidas económicas por esta razón disminuirían considerablemente.

Actualmente en el mercado sólo se encuentran probióticos de importación lo que los hace muy costosos, la elaboración de éstos con las cepas estudiadas en este trabajo reduciría los gastos de elaboración y podría ser muy factible introducirlos en el mercado nacional.

Es conveniente seguir las investigaciones con respecto a estas cepas para incluirlas en este tipo de productos, ya que aquí se comprobó que todas inhiben el crecimiento de la *E.coli*, pero podría realizarse un estudio para comprobar si las bacterias entre ellas tienen un efecto antagónico con respecto a las otras.

Es conveniente realizar también estudios de estabilidad del producto y de la actividad de las cepas, para poder comercializarlo.

B I B L I O G R A F I A

1(a).-Alvarez, M., García, B. (1993), XXVIII CONGRESO NACIONAL DE LA ASOCIACION MEXICANA DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS EN CERDOS, A.C. Estudio de la resistencia de las bacterias ácido-lácticas a antibióticos.

1.-Andrieux, C., Gabelle, D., Leprince, C., and Sacquet, E. (1989) Effects of some poorly digestible carbohydrates on bile acid bacterial transformation in the rat. Brit. J. Nutr., 62, 103-119.

2.-Barrow. P.A., Brooker, B.E., Fuller, R. and Newport, M.J. (1980) The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and its importance in the microecology of the intestine. J. Appl. Bacteriol., 48, 147-154

3.-Brock, D.T., Smith, D.W., Madigan, M.T. (1987) Microbiología. Edit. Prentice Hall. Ed 4°, 751

4.-Cole, C.B., Fuller, R. (1984) A note on the effect of host specific fermented milk on the coliform population of the neonatal rat gut. J. Appl. Bacteriol., 56, 495-498

5.-Collins, F.M. and Carter, P.B. (1978) Growth of salmonellae in orally infected germ free mice

6.-Contrepois, M. and Govet, P. (1969) Utilisation d' une technique microbiologique pour la mesure de la vitesse de transit des microparticules dans le tactus digestif des ruminants. C.R. Acad.Sci (Paris), 268, 1757-9

7.-Conway, P.L. Gorbach, S.L. and Goldin B.R. (1987) Survival of Lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. J. Dairy Sci., 70, 1-12

8.-Conway, P.L. and Kjelleberg, S. (1989) Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 to mouse stomach squamous epithelium. J. Gen. Microbiol. 135, 1175-86

9.-Conway, P.L. Welin, A. and Cohen, P.S. (1990). Present of K88 specific receptors in porcine ileal mucus is age dependent. Infect. Immun. 58, 3178-82

10.-Dabart, J., Dubos, F., Martinet, L. and D.R. (1979) Experimental reproduction of neonatal diarrhea in young gnotobiotic hares simultaneously associated with *Clostridium difficile* and other *Clostridium* strains. Infect. Immun., 24, 7-11.

11.-Davidson, J.N. and Hirsch, D.C. (1976) Bacterial competition as a means of preventing neonatal diarrhoea in pigs. Infection and Immunity 13, 1773-4

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

12.-Drasar, B.S. (1988) The bacteria flora at the intestine, in the role of the gut flora in toxicity and cancer. Academic Press, London, 23-28

13.-Ducluzeau, R., Ladiré, M., Callut, C. et al. (1977) Antagonistic effect of extremely oxygen-sensitive clostridia from the microflora of conventional mice and of *Escherichia coli* against *Shigella flexneri* in the digestive tract of gnotobiotic mice. Infect. Immun., 17, 415-24

14.- Ducluzeau, R. (1985) Implantation and development of the gut flora in the newborn piglet. Pig News Inform., 6, 415-18.

15.-Duval-Iflah Y., Raibaud, P. and Rousseau, M. (1981), Antagonism among isogenic strains of *Escherichia coli* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. Infect. Immun. 39, 957-959

16.-Duval-Iflah Y., Chappuis, J.P., Ducluzeau, R. and Raibaud, P. (1983) Intraspecific interactions, between *Escherichia coli* in human newborns and in gnotobiotic mice and piglets. Prog. Food Nutr. Sci. 7, 107-16

17.-Freter, R., Brickner, H., Botney, M. et al (1983a) Mechanisms that control bacterial populations in continuous-Flow culture models of mouse large intestinal flora. Infect. Immun. 39, 676-85.

18.-Freter, R., Brickner, H., Fekete, J. et al (1983b) Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. Infect. Immun. 39, 636-703

19.-Fuller, R. Barrow, P.A. and Brooker, B. E. (1978). Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. Appl. Environ. Microbiol., 35, 582-91

20.-Fuller, R. (1986) Probiotics. J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement 18-7s

21.-Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol., 66, 365-78

22.-Fuller, R. (1992) Probiotics. The scientific basis. Edit. Chapman and Hall. London

23.-Gemell, C.G. (1984) Comparative Study of the nature and biological activities of bacterial enterotoxins. J. Med. Microbiol. 17, 217-235

24.-Govet, P., Fonty, G., Jovany, J.P. and Nebout, J.M. (1984) Cellulolytic bacteria establishment and rumen digestion in lambs isolated after birth. Can.J. Anim. Sci. Suppl, 64, 163-4

25.-Hale, O.M. and Newton G.L. (1979) Effects of a nonviable *Lactobacillus* species fermentation product on performance of pigs. *J. Anim. Sci.*, 48, 770-75

26.-Havenaar, R. and Huis in't Veld, J.H.J. (1992) Probiotics: a general view, in lactic acid bacteria in health and disease, Vol. 1 (ed. J.B.J. Wood), Elsevier Applied Science Publishers.

27.-Hentges, D.J., Stein, A.J., Casey, S.W. and Que, J.U. (1985) Protective role of intestinal flora against infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice: influence of antibiotics on colonization resistance. *Infect. Immun.*, 47, 118-22.

28.-Jawetz, E., Melnick, J.L. Adelberg, E.A. (1987) *Microbiología Médica Edit. Manual Moderno. Ed. 12ª* 238-240

29.-Johnsson, E. and Henningsson, S. (1991) Establishment in the piglet gut of lactobacilli capable of degrading mixed-linked β -D-glucans. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 512-5

30.-Kennedy, M.J., Rogers, A.L. and Yancery, R.J. (1988) An anaerobic continuous flow culture model of interactions between intestinal microflora and *Candida albicans*. *Mycopathologia*, 103, 125-34.

31.-Kikujitah and Rolf Freter. (1989) Control of *E. coli* populations by a combination of indigenous clostridia and lactobacilli in gnotobiotic mice and continuous-flow cultures. *Infection and Immunity*, 57, 2, 559-65.

32.-Koninsky, J. (1982) Clicins and other bacteriocins with an established mode of action. *Ann. Rev. Microbiol.*, 36, 125-44.

33.-Kroger, M. Kurmann, J.A. and Rasic, J.L. (1989) Fermented milks-past and present. *Food Technol.*, 43, 92-99.

34.-Lloyd-Evans, L.P.M. (1989) Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 141, 747-48.

35.-McGillivray, D.J., Cranwell, P.D. Cain, C.J. and Chandler, K.D. (1984) The microbiology of the pars oesophagea of sucking and weaned pigs. *Int. Pig Vet. Soc. Proc.*, 8, 235.

36.-Mitchell, I.G. and Kenworthy, R. (1976) Investigations on a metabolite from, *Lactobacillus bulgaricus* which neutralizes the effect of enterotoxin from *E. coli* pathogenic for pigs. *Journal of Applied Bacteriology* 4, 163-74.

37.-Moreau, M.C. Raibaud, P. and Muller, M.C. (1982) Relation entre le développement du système immunitaire intestinal à Ig A et l'établissement de la flore microbienne dans le tube digestif du souriceau hôte. *Ann. Immunol.* 1330, 29-39.

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

39.-Pollman, D.S., Danielson, D.M. and Peo, E.R. Jr (1980a) Effect of microbial food additives on performance of starter and growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 51, 577-81.

40.- Pallman, D.S., Danielson, D.M. Wren, W.B. and Shahani K.M. (1980b) Influence of *Lactobacillus acidophilus* inoculum on gnotobiotic an conventional pigs. *Journal of Animal Science.* 51, 629-32.

41.-Pollman, D.S. (1986) Probiotics in pigs diets. In: Haresing W. and Cole D.J. A. (Eds) *Recent Advances in Animal Nutrition 1966*, 193-205.

42.-Raibaud, P., Ducluzeau, R. Dubos, F. ET al (1980) Implantation of bacteria from the digestive tract of man and various animals into gnotobiotic mice. *Amer J. Clin. Nutr.*, 33, 2440-7.

43.-Ratcliffe, B., Cole, C.B., Fuller, R. and Newport, M.J. (1986) The effect of yoghurt and milk fermented with a porcine intestinal strain of *Lactobacillus reuteri* on the performance and gastrointestinal flora of pigs weaned at two days of age. *Food Microbiol.* 3, 203-11.

44.-Rettger, L.F., Leuvy, M.N. weinstein, L. and Weiss, J.E. (1935) *Lactobacillus acidophilus* and its. Therapeutic Application, Yale University Press, New Haven, Connecticut.

45.-Rojas Ximena y Prüssing Horacio. (1978) Colibacilosis: Aislamiento, serotificación y pruebas de enteropatogenicidad de *E. coli* de origen fecal. Arch. Med. Vet. 10, 145-48.

46.-Rowland, I.R., Mallett, A.K. and Wise, A. (1985) The effects of diet on the mammalian gut flora and its metabolic activities CRC Crit. Rev. Toxicol., 16, 31-103.

47.-Rowland, I.R., Granli, T., Bockman OC et al. (1991) Engogeneous-nitrosation in man assessed by measurement of apparent total-nitroso compounds in faeces, Carcinogenesis, 12, 1395-1401.

48.-Sacquet, E. Raibaud, P., Mejean, C. et al., (1979) Bacterial formation of ω -muricholic acid in rats. Appl. Environ. Microbiol., 37, 1127-31.

49.-Tannock, G.W. (1983) Effect of dietary and environmental stress on the gastrointestinal microbiota, in human intestinal microflora in health and disease, Academic Press, New York, 517-39.

50.-Thijm, H.A. and van der Waaij, D. (1979) The effect of three frequently applied antibiotics on the colonization resistance of the digestive tract of mice. *J. Hyg.*, 82, 397-405.

51.- van der Waaij, D. Berghuis de Uries, J.M. and Lekkerkerk van der Wees, J.E.C. (1971) Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J. Hyg.*, 69, 405-11.

52.-Walton., J.R. (1980) Modes of action of growth promoting agents. *Fortschr. Vet. Med.*, 33, 77-82.