

**Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A.C.**

**EVALUACIÓN PROBIÓTICA DE ESPECIES
DE *BIFIDOBACTERIUM* EN CERDOS
LACTANTES**

Por:

Verónica Corona Escamilla

Dirección de Ciencias de los Alimentos

Maestría en Ciencias

Hermosillo, Sonora

Diciembre del 2003

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente.

Para la reproducción parcial o total de este manuscrito con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Apartado postal 1735, Hermosillo, Sonora, México.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis.

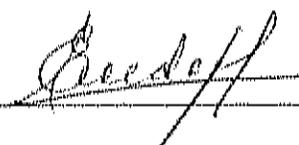
ATENTAMENTE



Dr. Alfonso Antero Gardea Béjar
Director General

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Verónica Corona Escamilla, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

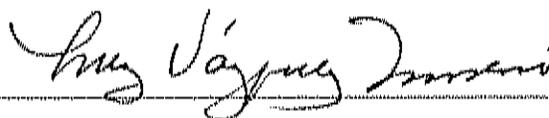


Dra. Evelia Acedo Félix

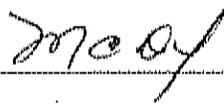
Directora de Tesis



Dra. Araceli Pinelli Savedra



Dra. Luz Vázquez Moreno



Dra. Martha Elvia Díaz Cinco

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme apoyado económicamente durante mis estudios.

Gracias a la institución CIAD por haber confiado en mi y por brindarme un espacio en el cual me desarrollara para lograr mi meta de postgrado.

Estoy muy agradecida con la Dra. Evelia Acedo Félix de quien incondicionalmente siempre tuve su apoyo, y quien fue más que la directora de mi investigación, fue y será por siempre sinceramente mi amiga, uno de los pilares importante en el mismo.

Expreso también mi más preciado reconocimiento a la Q.B. Rosalva Pérez Morales, pieza fundamental por igual (el otro pilar) para el desarrollo de mi investigación, amiga querida muchas gracias.

Gracias Doctora, gracias Rosalba, gracias Poncho, gracias Claudia, gracias a todos ustedes (Yoly Flor, Susy Flor, Ana Lilia, Marce, Frank, Martha Díaz), nunca olvidaré lo mucho que me ayudaron.

También se reconoce y se agradece la labor de los sinodales, quienes aportaron su apoyo hasta donde pudieron y más.

Gracias al Dr. Córdova, por las facilidades de trabajo en la Granja Sta. Bruna, donde realicé parte de mi estudio. Gracias por la confianza.

Por último y no menos importante agradezco al Dr. Juan Pedro Camou por su apoyo sincero en mis estudios.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a ese grupo de microbiología, quienes sin lucro alguno me dieron la mano tanto en el aspecto profesional como personal.

Gracias muchachos, los llevaré siempre en el corazón!

Incertidumbre

*Sombras inestables amenazantes en el camino,
Lluvias tormentosas sin fin opacando el horizonte.
Sol, sol!! Ilumina el sendero!
Seca la humedad llorada
Y deja que tus rayos toquen mi piel
Brindando calor y tranquilidad al alma.
Sol, sol!! No me abandones!
Que bajo tu regazo tu calor me protege,
Caminando a mi lado orgulloso de lo que eres
Sol, sol, sol!!! Tu eres mi camino.*

Agradecida

*Agradecida estoy a Dios
Quien con amor me brindó la vida
Puesta en un vientre puro
El cual siempre me tiene protegida.*

*Agradecida estoy, sin embargo
Con otras personas de buen corazón
Quienes supieron estar a mi lado
Cuando me faltaba del ser la razón.*

*Señalo a una mujer, de brillante hermosura,
Hermosura interna mejor valorada
Valor sumado a su cuerpo mortal
Figura por lo mismo aumentada.*

*Agradecida estoy pues a esta mujer
Por ser mi escudo en esos días
Protector y apoyo en la guerra
Amiga muy querida diría.*

*En mi mente por siempre se encuentra
Una amiga inquieta, traviesa y sonriente,
A quien con solo ver las rosas y el alba
La recuerdo por consiguiente.*

*Recuerdo de días pasados
Pestes, cerdos y barullos
Tus sacrificios a mi lado
Mi corazón y amistad
Por lo tanto por siempre tuyos.*

*Como dejar a un lado
A un demonio sutil,
Demonio un poco raro
Pero demonio al fin.*

*Y si de cosas raras hablamos
Tengo en mi corazón a una anaconda
Quien con su amistad sincera
Dio a mi vida una felicidad onda.*

*Aunque no los mencione,
Los recuerdo a todos muy bien
Y agradecida les estoy
Estén donde estén.*

CONTENIDO

RESUMEN.....	ix
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	3
General.....	3
Específicos.....	3
ANTECEDENTES.....	4
<i>Bifidobacterium</i>	4
Taxonomía.....	4
Características del Género.....	6
Requerimientos nutricionales y atmosféricos.....	9
Enzima Fructosa, 6-fosfatofosfocetolasa (F6PPK EC 4.1.2.22).....	12
Resistificación.....	13
Probióticos.....	15
Criterios de Selección de Probióticos.....	17
Origen de la cepa.....	17
Organismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS).....	18
Resistencia a ácidos gástricos y sales biliales.....	19
Antagonismo bacteriano.....	22
Los Probióticos Como una Alternativa al Uso de Antibióticos Promotores del Crecimiento.....	24
Beneficio de los Probióticos en Animales.....	27
A nivel inmunológico.....	29
A nivel ambiental.....	34
A nivel fisiológico.....	35
A nivel patológico.....	37
Explotación en los Sistemas de Producción de Granjas Porcícolas.....	39
MATERIALES Y METODOS.....	42
Aislamiento de la Bifidobacteria.....	42
Prueba de la Presencia de la enzima Fructosa, 6- fatofosfocetolasa.....	43
Biotipificación.....	43
Prueba de Resistencia a pH bajos.....	44
Determinación cualitativa.....	44
Determinación cuantitativa.....	44
Prueba de Resistencia a Sales Biliares.....	47
Determinación cualitativa.....	47
Determinación cuantitativa.....	48

Antagonismo Bacteriano.....	48
Antibiograma.....	49
Estudio <i>in vivo</i>	50
Animales y Manejo.....	50
Toma de Muestras.....	50
Cepas.....	52
Inoculación en Lechones.....	52
Desempeño de lechones.....	52
Determinación de IgA e IgG por Inmunodifusión Radial.....	55
Análisis histológicos.....	55
Análisis Estadísticos.....	56
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	57
Cepas Aisladas.....	57
Caracterización Probiótica.....	60
Resistencia a pH 3.0.....	60
Resistencia a Sales Biliares.....	62
Antagonismo Bacteriano.....	64
Antibiograma.....	67
Estudio <i>in vivo</i>	71
Determinación de inmunoglobulinas.....	75
IgA.....	75
IgG.....	76
Análisis histológico.....	81
CONCLUSIONES.....	88
RECOMENDACIONES.....	90
BIBLIOGRAFIA.....	91

INDICE DE TABLAS

1.- Especies de <i>Bifidobacterium</i> sp. Aisladas de distintos hábitats	7
2.- Características de un buen probiótico.....	16
3.- Niveles de pH por porción de cada órgano intestinal de los cerdos.....	21
4.- Beneficios potenciales de los probióticos para animales de granja.....	28
5.- Concentración de inmunoglobulinas en el calostro y leche de cerdas.....	31
6.- Concentración de IgA en suero de cerdos a distintas edades.....	32
7.- Características de fermentación de las especies de bifidobacterias.....	45
8.- Dosis del probiótico administrado a los lechones.....	54
9.- Porcentaje de aislamiento de las especies de <i>Bifidobacterium</i>	58
10.- Efecto antagónico de las cepas de bifidobacterias contra los patógenos <i>E. coli</i> y <i>Salmonella choleraesuis</i>	66
11.- Antagonismo bacteriano entre las cepas de bifidobacterias aisladas del tracto gastrointestinal del cerdo.....	68
12.- Susceptibilidad de las cepas a distintos antibióticos.....	70
13.- Desempeño de los lechones suplementados con bifidobacteria y control.....	73
14.- Concentración de IgA (mg/dl) en lechones durante el estudio con probióticos y control.....	77
14.- Concentración de IgG (mg/dl) en lechones durante el estudio con probióticos y control.....	78
15.- Análisis histopatológicos en intestinos de lechones sacrificados a los 8 días de su nacimiento.....	82
16.- Análisis histopatológicos en intestinos de lechones sacrificados a los 21 días de su nacimiento.....	83

LISTA DE FIGURAS

1.- Esquema representativo de las pruebas de fermentación en micro placa de ELISA, utilizadas en la identificación de especies de <i>Bifidobacterium</i>	46
2.- Extracción de sangre de la vena yugular del lechón.....	51
3.- Alimentación de los lechones con agujas tiraleche.....	53
4.- Especies de bifidobacterias aisladas por órganos muestreados en cerdos sanos recién sacrificados.....	59
5.- Porcentaje de resistencia al tránsito gastrointestinal de las especies de <i>Bifidobacterium</i>	61
6.- Concentración de IgA e IgG en suero de lechones en los diferentes días de muestreo	80
7.- Observaciones mas sobresalientes del análisis de los cortes histológicos de intestinos de cerdos en los 8 y 21 días. Corte histológico de intestino normal (B); cortes histológicos de intestinos dañados (B; C; D; E y F)	84

RESUMEN

Debido al desarrollo de la industria porcina, se han buscado técnicas de manejo y nutrición que mejoren la producción. Los probióticos son una excelente alternativa al uso de promotores de crecimiento, como alternativa a los antibióticos, por los múltiples beneficios que brinda al animal y la ausencia de productos secundarios. Se aislaron 72 cepas de *Bifidobacterium* sp. de cerdos sanos recién sacrificados de un rastro tipo inspección federal (TIF), 56% del intestino delgado y 44% del intestino grueso. 37 cepas resistieron en un 40% al pH bajo y de estas 32 cepas sobrevivieron a las sales biliares. Todas las cepas fueron antagónicas contra *S. choleraesuis* y *E. coli* K88. Se seleccionaron tres cepas de *B. infantis*, con características probióticas y se les administró a cerdos de dos días de nacidos por un periodo de 20 días. No hubo diferencias significativas ($P>0.05$) en la ganancia de peso. Solamente se presentaron diarreas en las camadas de cerdos del grupo control. El análisis tisular reveló un estado óptimo en el grupo con tratamiento a diferencia del grupo control, el cual se observó muy dañado. Las concentraciones de IgG en los cerdos control se mantuvo por encima del grupo problema pero sin significancia estadística ($P>0.05$). Sin embargo, la IgA mostró niveles más altos a los 11 y 21 días de edad en los cerdos inoculados con probióticos. Las bifidobacterias expresaron buenas características probióticas en lo que respecta a resistencia a pH bajos y sales biliares porcinas, así como con el antagonismo contra otras bacterias patógenas. Las bacterias no tuvieron capacidad para aumentar el peso en

los lechones, el sistema inmunológico y proteger al intestino de daños tisulares por diversas agresiones.

INTRODUCCIÓN

La porcicultura está considerada como una importante actividad generadora de empleos e ingresos económicos, en muchos países. Este tipo de producción beneficia en gran medida a otras industrias, como a los productores de alimentos balanceados y de granos forrajeros (Berreira, 1996). En México, Sonora es el segundo estado con mayor producción de carne de cerdo de alta calidad en el país (SAGARPA, 2003). Esto ha permitido a los poricultores sonorenses exportar carne a Estados Unidos y Japón, por ser un estado libre de fiebre porcina clásica y de contar además con leyes de clasificación de carnes. Este logro fue el resultado del impulso tecnológico y productivo aplicado a la actividad porcina (Montijo, 1995).

Dentro de los programas productivos, se ha recomendado el seguimiento de las buenas prácticas en los sistemas de producción de las granjas, enfocados a reducir la incidencia y prevalencia de enfermedades (Stephano & Asociados, 1999). Para lograr estos objetivos también se han desarrollado nuevas técnicas y métodos de alimentación, como es el uso de aditivos en los alimentos de los animales en forma de agregados a las raciones empleadas en las distintas etapas productivas (León, 1992). Las investigaciones efectuadas en torno a estos aditivos han determinado un efecto positivo en la aplicación de antibióticos y probióticos (Abe, 1995). Sin embargo, el abuso de productos como los antibióticos puede reducir el nivel de microorganismos intestinales,

desequilibrando la flora microbiana, provocando procesos diarreicos. Sumado a todo lo anterior, estos aditivos originan el desarrollo de la resistencia microbiana a los mismos y se tornan deficientes en las terapias (Abe, 1995; Mantecón & Ahumada, 2000).

La aplicación de probióticos ha atraído la atención de grupos de investigación por sus propiedades benéficas sin efectos adversos (Abe, 1995). La implementación de este tipo de tratamiento se basa en la necesidad de mantener el equilibrio en la flora normal de tracto digestivo, para que se recupere el balance microbiano, además de estimular el sistema inmune (Mantecón & Ahumada, 2000). Dentro de las especies probióticas de mayor interés, se encuentran *Lactobacillus* sp, *Streptococcus* sp, *Bifidobacterium* sp y otras especies bacterias ácido lácticas y levaduras (Corona, 2001). Estas especies representan una alternativa al uso de antimicrobianos, ya que son cultivos microbianos vivos que mejoran la salud y crecimiento del cerdo (Doyle, 2001; Kúrti, 2001).

El objetivo de este trabajo fue el de caracterizar especies de *Bifidobacterium* aisladas del tracto gastrointestinal de cerdo sano, en base a sus características probióticas *in vivo* y probar su efecto *in vitro*, en lechones a partir de los dos días de edad.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Caracterizar especies de *Bifidobacterium* aisladas del tracto gastrointestinal de cerdo sano, en base a sus características probióticas *in vitro* y su efecto *in vivo*.

Objetivos Particulares

- Determinar el antagonismo microbiano de las cepas de *Bifidobacterium* sp, aisladas de cerdo sano de término.
- Determinar el efecto de *Bifidobacterium* sp en la ganancia de peso en los cerdos lactantes por medio de la implantación del probiótico en el tracto gastrointestinal.
- Determinar el efecto en la producción de IgG e IgA de los cerdos recién nacidos al administrarles *Bifidobacterium* sp, como probiótico.
- Determinar el estado tisular del intestino al término de cada tratamiento.

ANTECEDENTES

Bifidobacterium

Taxonomía

Desde el aislamiento de la primera cepa de bifidobacteria por Tissier en 1899 en el Instituto Pasteur, se han descrito 37 especies de bifidobacterias. Los primeros trabajos taxonómicos de las bacterias se basaron en características morfológicas y con el paso de los años, se fueron incluyendo nuevos criterios de clasificación. La introducción de los caracteres de fisiología, requerimientos nutritivos, características metabólicas y enzimáticas de los microorganismos fueron hechos por Orla-Jensen en 1924. Esto provocó una reclasificación de bifidobacteria, que originalmente se llamaba *Bacillus bifidus* a *Bifidobacterium bifidum*. Así mismo, la clasificación de esta bacteria dentro del género *Lactobacillus* también fue reconsiderada debido a la carencia de las enzimas aldolasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasas por parte de las bifidobacterias, estas son dos enzimas importantes encontradas en los lactobacilos. Sumado a lo anterior, se determinó la ausencia de la enzima Fructosa 6-fosfatofosfocetolasa en los lactobacilos, la cual está presente únicamente en las bifidobacterias (Ballongue, 1998).

En 1960, se marcó un cambio en el sentido de la clasificación bacteriana con el desarrollo de la quimiotaxonomía. En este período se describieron más especies de *Bifidobacterium* (*B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B.*

"*lactensis*", *B. "liberorum"*, *B. longum* y *B. "parvulum"*) (Pot y cols., 1994), las cuales fueron diferenciadas en base a sus características serológicas y fermentativas (Ballongue, 1998). Hasta 1969 se tenían identificadas 16 especies, con la descripción de las especies de *B. thermophilum*, *B. "longum" subsp. animalis*, *B. pseudolongum*, *B. globosum*, *B. ruminale*, *B. asteroides*, *B. indicum* y *B. coryneforme* (Pot y cols., 1994).

Con el progreso de la genética molecular en 1965, fué posible diferenciar mas especies de bifidobacterias (Ballongue, 1998). Se describió que el género *Bifidobacterium* posee un alto contenido de G + C en el DNA (55-67 mol%) (Scardovi, 1986; Ballongue, 1998; Schleifer & Ludwig, 1995; Gomes & Malcata, 1995). Esta característica lo coloca en la rama de los *Actinomycetes* de las bacterias Gram positivas y las diferencia de los *Lactobacillus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium* (Ballongue, 1998; Gomes & Malcata, 1999). Los datos reportados para clasificar a estas bacterias, no incluyen las propiedades actualmente identificadas como especies moderadamente tolerantes al oxígeno como *B. lactis* (Gomes & Malcata, 1999; Meile y cols., 1997).

Con la aplicación de técnicas moleculares se hizo la descripción de nuevas especies. La técnica de hibridación DNA-DNA permitió la identificación de *B. suis*, *B. angulatum*, *B. dentium*, *B. catenulatum*, *B. pullorum*, *B. magum*, *B. boum*, *B. choerinum*, *B. cuniculi* y *B. pseudocatenulatum*. También subió a rango de especie a *B. longum* subsp. *animalis*, como *B. animalis*. Con la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de un extracto de proteínas totales, se logró describir las especies de *B. minimum*, *B.*

coryneforme, *B. globosum*, y *B. subtile* (Pot, y cols., 1994). Con los métodos genotípicos también se ha definido la igualdad de algunas especies; *B. "liberorum"* y *B. "lactensis"* fueron identificadas como *B. infantis*; *B. "parvulorum"* como *B. breve* y *B. "ruminale"* como *B. thermophilum* (Watabe y cols., 1983).

Actualmente se han descrito especies nuevas: *B. gallinarum* (Watabe y cols., 1983), *B. gallicum* (Lauer, 1990), *B. merycicum*, *B. ruminantium* (Biavatti & Mattarelli, 1991) *B. denticolens*, *B. inopinatum* (Crociani y cols., 1996), *B. lactis* (Meile y cols., 1997), *B. thermacidophilum* (Dong y cols., 2000) y *B. scardovii* (Hoyles y cols., 2002). En total son 34 especies y 2 subespecies las que se han aislado, 13 especies provienen de fuentes humanas, 14 de animales, 3 de abejas, 3 de aguas contaminadas y una de leches fermentadas (Tabla 1) (Scardovi, 1986; Lauer, 1990; Watabe y cols., 1983; Crociani y cols., 1996; Meile y cols., 1997; Biavatti y cols., 1991, 1992; Dong y cols., 2000; Hoyles y cols., 2002).

Características del Género

Las especies de bifidobacterias se han descrito como bacilos rectos, bacilos bifurcados o bacilos con múltiples ramificaciones, con formación de bastón y extremos semejantes a una flama (Miller-Catchpole, 1989a). Pueden ser bacilos cortos, regulares o delgados, así como células cocoides regulares. Se pueden presentar solas o en cadenas de muchos elementos, en agregados formando una figura similar a una estrella, en forma de "V" o en empalizada.

Tabla 1. Especies de *Bifidobacterium*, aisladas de distintos hábitat.

Humanos	Animales	Abejas	Aguas contaminadas	Leches fermentadas
<i>B. bifidum</i>	<i>B. globosum</i>	<i>B. coryneforme</i>	<i>B. minimum</i>	<i>B. lactis</i>
<i>B. longum</i>	<i>B. pseudolongum</i>	<i>B. asteroides</i>	<i>B. subtilis</i>	
<i>B. infantis</i>	<i>B. cuniculi</i>	<i>B. indicum</i>	<i>B. thermacidophilum</i>	
<i>B. breve</i>	<i>B. choerinum</i>			
<i>B. adolescentis</i>	<i>B. animalis</i>			
<i>B. angulatum</i>	<i>B. thermophilum</i>			
<i>B. catenulatum</i>	<i>B. boum</i>			
<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. magnum</i>			
<i>B. dentium</i>	<i>B. pullorum</i>			
<i>B. gallicum</i>	<i>B. suis</i>			
<i>B. inopinatum</i>	<i>B. saeculare</i>			
<i>B. denticolens</i>	<i>B. ruminantium</i>			
<i>B. scardovii</i>	<i>B. merycicum</i>			
	<i>B. gallinarum</i>			

(Scardovi, 1986; Lauer, 1990; Watabe y cols., 1983; Crociani y col., 1996; Meile y col., 1997; Biavati y col., 1991, 1992; Dong y cols., 2000)

Las colonias cremosas, convexas, de bordes enteros, de crema a blancas, brillantes y de consistencia dura. Son bacilos Gram positivos, no formadores de esporas, sin movilidad. Se tiñen irregularmente con azul de metileno (Scardovi, 1986) y con la tinción de Gram (Miller-Catchpole, 1989a). La bacteria puede medir de 0.5-1.3 X 1.5-8.0 (Holt y cols., 1994). El género *Bifidobacterium* tiene una morfología celular pleomórfica, dependiente de sus especies y del medio del cultivo donde es crecido (Miller-Catchpole, 1989a; Scardovi, 1986). Se puede comparar la morfología de varias especies sembradas en triptona-peptona-extracto de levadura (TPY). Arreglos en "V" o en empalizada de *B. angulatum*, las cadenas largas de *B. pullorum*, las células grandes de *B. magnum*, las células pequeñas de *B. minimum* y el inusual arreglo de *B. asteroides* en forma de estrella. Así mismo, existen especies como las de *B. indicum* y *B. asteroides* que no presentan la morfología bifida característica de este género (Scardovi, 1986).

Los medios de cultivos pueden variar la forma de las bacterias por deficiencias en algún nutriente, así como por la presencia de otros (Corona, 2001). Por ejemplo *B. bifidum* crece en un medio de cultivo deficiente en β -metil-N-acetil-D-glucosamina, se determinó que el grado de deficiencia de este aminoazúcar es proporcional al grado de ramificaciones.

Así mismo, se han hecho estudios en una bifidobacteria altamente ramificada crecida en un medio mínimo. Al adicionar algunos aminoácidos a este medio como serina, alanina, ácido aspártico y ácido glutámico o por triptona (digerido pancreático de caseína), se observaron bacilos curvados o

formas bifidas. Existen también algunas sales que pueden alterar la morfología, las sales de sodio aumentan las ramificaciones (Miller-Catchpole, 1989a) y el calcio en algunos casos puede revertir esta morfología a formas baciloides (Poupard y cols., 1973).

Las ramificaciones o las formas bifidas de las bifidobacterias, no son un precursor de algún tipo de forma resistente o de esporas. Son solamente una adaptación a una imperfecta formación de la pared celular en un medio de cultivo que permite del crecimiento del citoplasma. Esto se debe a la deficiencia de la separación o división del septo después de su formación, o a un desarrollo asimétrico del septo divisional, por la falta de aminoácidos o aminoazúcares (Miller-Catchpole, 1989a).

Requerimientos nutricionales y atmosféricos. Las bifidobacterias no son un grupo nutricionalmente homogéneo y han sido reportados distintos tipos nutricionales de bifidobacteria. En estudios hechos en este aspecto, se ha determinado que la utilización de cisteína por las bifidobacterias es indispensable para la obtención de sales de amonio como fuente de nitrógeno. Esta es una de las más notables diferencias entre los requerimientos nutricionales, comparados con el género *Lactobacillus*, los cuales tienen un sistema nutricional más complejo (Poupard y cols., 1973). Las especies de *B. suis*, *B. magnum*, *B. choerinum* y *B. cuniculi* solo crecen en presencia de nitrógeno orgánico (Ballongue, 1998).

B. bifidum crece solo en presencia de magnesio, manganeso y todas las formas del hierro. El hierro ferroso (Fe^{2+}) lo usan a pH 5 y su incorporación al sistema, depende de la ATPasa de membrana y puede ser inhibido competitivamente por zinc. El hierro férrico (Fe^{3+}) se utiliza a pH neutro en la producción de ácido acético por las ferrozimas. La lactoferrina con sus complejos de metales (Fe, Cu, Zn) es un buen promotor del crecimiento de las bifidobacterias, además de que es inhibidor de *E. coli* y *S. aureus* (Ballongue, 1998).

Los nutrientes que comúnmente necesitan estas bacterias son: biotina y pantotenato de calcio, así mismo, la purina y pirimidina, aunque no muy esenciales, la cisteína no puede ser sustituida por metionina, homocisteína o compuestos relacionados (Poupard y cols., 1973). Las vitaminas esenciales son: tiamina, piridoxina, ácido fólico, cianocobalamina y ácido nicotínico (Ballongue, 1998).

El factor esencial (factor bífido) en la leche humana, el cual se ve notablemente disminuido en la leche de vaca, son los sacáridos que contienen la N-acetil-D-glucosamina. Este compuesto lo utilizan las bifidobacterias para la síntesis de la pared celular. Existen derivados de este compuesto que promueven el crecimiento de estas bacterias mejor que la N-acetil-D-glucosamina. Probablemente se deba a que estos derivados disminuyen su velocidad de conversión a glucosamina-6-fosfato y la deaminación de la misma a fructosa-6-fosfato. Todo esto hace capaz a la bacteria de utilizar más eficientemente la glucosamina-6-fosfato para la síntesis de la pared celular. La

poca promoción del crecimiento de estas bacterias por la N-acetil-D-glucosamina comparada con otros N-glucosamino sustitutos, es debida a la rápida conversión de este compuesto a fructosa 6-fosfato, el cual es degradado en su mayoría por la vía acetil fosfato a acetato y lactato en una relación de 3:2 (Poupard y cols., 1973).

La lactulosa y los fructologosacáridos no son metabolizados por el tracto digestivo de los humanos o especies animales, por lo que llegan intactos al colon donde son utilizados por las bacterias, principalmente por las bifidobacterias, aunque no de forma exclusiva. Por lo tanto, estos azúcares no son considerados un buen factor bifidogénico. La rafinosa, estaquiosa y la inulina son utilizadas exclusivamente por la *B. infantis* y no por otras bacterias intestinales (Ballongue, 1998).

Las bifidobacterias son microorganismos estrictamente anaerobios, sin embargo, la sensibilidad al oxígeno varía notablemente entre cepas y especies (Scardovi, 1986). Las razones probables a esta variación pueden ser debidas a que en condiciones aerobias, estas bacterias tienden a acumular peróxido de hidrógeno, el cual es reducido por un sistema NaOH peroxidasa, que varía dependiendo de la cepa. La cepa más sensible a la presencia de oxígeno tiene más baja actividad de NaOH peroxidasa, lo que provoca una acumulación de peróxido, el cual es tóxico para las células porque no poseen la enzima catalasa (Ballongue, 1998), aunque en presencia de aire, las bifidobacterias se vuelven catalasa-positivo si se les suma hemina al medio (Scardovi, 1986). El peróxido de hidrógeno causa un bloqueo en el camino de la fermentación por la

inactivación de la enzima Fructosa-6-fosfato-fosfocetolasa (F6PPK), la cual es una enzima clave en el metabolismo de este organismo (Poupard y cols., 1973).

El pH óptimo de crecimiento para las bifidobacterias es de 6-7, sin crecimiento por debajo de 4.5-5.0, o bien por encima de 8.0-8.5. Estas bacterias pueden crecer a de 37-41°C, con crecimiento mínimo a 25-28°C y 43-45°C (Gomes & Malcata, 1999; Scardovi, 1986).

Enzima Fructosa 6-fosfatofosfocetolasa (F6PPK EC 4.1.2.22). Debido a la morfología que presenta la bifidobacteria, esta puede ser confundida con otros géneros muy pleomórficos como *Actinomyces* sp, *Corynebacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Clostridium* sp., *Arthrobacter* sp. y *Propionibacterium* sp. (Miller-Catchpole, 1989b; Scardovi, 1986). La prueba no molecular, mas directa y fiable de las características asignadas al organismo del género *Bifidobacterium* está basada en la demostración de la presencia de la enzima F6PPK en los extractos celulares, la cual esta ausente en los otros géneros, a excepción del aerobio obligado *Acetobacter xylinum* y *Leuconostoc mesenteroides* que también poseen esta enzima (Orban & Patterson, 2000; Scardovi, 1986; Poupard y cols., 1973). Esta prueba no es capaz de distinguir entre especies de bifidobacterias (Ballongue, 1998).

Las bifidobacterias metabolizan la glucosa exclusivamente por el camino de la Fructosa 6-fosfato-fosfocetolasa, donde la convierten a fructosa 6-fosfato la cual es hidrolizada por la fosfocetolasa a eritrosa-4-fosfato, acetil fosfato y agua. Las moléculas de acetil fosfato pueden ser medidas con procedimientos

colorimétricos por observación visual de un color rojizo-violeta (Miller-Catchpole, 1989b). La eritrosa-4-fosfato y la fructosa 6-fosfato son convertidas a 2 moles de pentosa fosfato por la acción de la transaldolasa y transcetolasa. La xilulosa-5-fosfato es entonces hidrolizada por la fosfocetolasa a acetil fosfato y gliceraldehido-3-fosfato. El gliceraldehido-3-fosfato es convertido a piruvato, el cual se reduce a lactato o bien hidrolizado por una reacción fosforoclástica a acetato y formato (Poupard & cols., 1973).

El ensayo propuesto por Scardovi (1986) consume mucho tiempo debido a que se emplean de 5 a 10 minutos de sonicación para cada cepa, con la desventaja de analizar un pequeño número de muestras. En investigaciones recientes se ha realizado una modificación al procedimiento que nos permite el análisis de un mayor número de muestras, en menor tiempo y con equipos no tan caros. En este trabajo utilizaron el detergente de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (bromuro de cetrimonio, CTAB) para romper las células en lugar del sonicador (Orban & Patterson, 2000).

Resistipificación. La determinación de la susceptibilidad a los antibióticos por las bifidobacterias es de gran interés por diversos motivos, en los que no solo se aplica a los casos patógenos sino que también al desbalance que un antibiótico puede ocasionar a la microflora (Miller-Catchpole, 1989b). Así mismo, un antibiograma puede contribuir a la selectividad del medio de cultivo para las bifidobacterias (Ballongue, 1998). También es muy común administrar el probiótico con antibióticos en el mismo alimento, para obtener un sinergismo en

la respuesta entre ambos promotores de crecimiento (Nousiainen & Setälä, 1993).

El género es más resistente a kanamicina, neomicina, estreptomina, ácido nalidíxico y metronidazol (Scardovi, 1986). La resistencia es uniforme en el género. Sin embargo, para los antibióticos tales como polimixina, neomicina, kanamicina, estreptomina o ácido nalidíxico, varía notablemente dentro de las especies, y el rango puede estar entre 10-500 o más $\mu\text{g/mL}$ de antibiótico (Scardovi, 1986; Ballongue, 1998). Las bifidobacterias no son susceptibles a metronidazol, que actúa contra casi todos los microorganismos anaerobios obligados, debido a que este actúa sobre un sistema de ferredoxina para crear un producto intermedio que interactúa con la síntesis de DNA. Este sistema ferredoxina no lo poseen las bifidobacterias.

Por otro lado estas bacterias son susceptibles a penicilina, eritromicina, clindamicina, vancomicina (Miller-Catchpole, 1989b), oleandomicina, lincomicina, ampicilina, bacitracina, cloranfenicol y nitrofurantoina (Scardovi, 1986). La susceptibilidad de las bifidobacterias hacia la tetraciclina varía notablemente de una especie a otra y dentro de las especies de una cepa a otra (Ballongue, 1998). Se ha manejado que las bifidobacterias pueden ser un buen prebiótico, ya que son las primeras bacterias que se implantan en el tracto gastrointestinal durante los primeros días de nacimiento de los animales alimentados al seno materno.

Probióticos

Un probiótico es un suplemento de origen microbiano que afecta benéficamente al huésped por modulación de la inmunidad sistémica y de la mucosa y proporciona un balance nutricional y microbiano en el tracto gastrointestinal (Naidú y cols. 1999). Actualmente los probióticos más comunes que se están usando en animales son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y levaduras como *Saccharomyces* y *Torulopsis* y hongos del género *Aspergillus* (Dunne y cols., 2001).

Los beneficios en la salud del huésped por estos microorganismos, se pueden categorizar en beneficios nutricionales o beneficios terapéuticos. Dentro de lo nutricional se encuentra su papel para aumentar la biodisponibilidad de calcio, zinc, hierro, manganeso, cobre y fósforo (Prasad y cols., 1998). El género *Bifidobacterium* ha llamado la atención últimamente porque sintetiza y excretan vitaminas solubles en agua con considerables diferencias entre las especies (MacFarlane & Cummings, 1999). A nivel terapéutico, un probiótico puede ser utilizado para tratamientos de desórdenes intestinales, hipercolesterolemia, supresión de enzimas procarcinogénicas e inmunomodulación entre otros (Prasad y cols., 1998). En la Tabla 2 se enlistan una serie de características y propiedades que debe tener un microorganismo para ser considerado como prebiótico.

Tabla 2 .Características de un buen probiótico en animales.

-
1. La cepa debe proporcionar beneficios al animal (ej. incremento en el crecimiento o resistencia a enfermedades).
 2. Debe ser no patogénica y no toxica.
 3. Debe estar presente en células viables, preferentemente en gran número (no se conoce la dosis efectiva mínima).
 4. Ser capaz de sobrevivir a las condiciones del tracto digestivo (resistencia a ácidos gástricos y ácidos orgánicos).
 5. Debe ser estable y capaz de permanecer viable por largos periodos bajo almacenamiento y condiciones de ambiente.
-

Tomado de: Fuller, 1989

Las bacterias probióticas son frecuentemente usadas como el ingrediente activo en los alimentos funcionales tales como bioyoghurts, suplementos dietarios y productos relacionados con la salud (Prasad y cols., 1998). Estos microorganismos no colonizan permanentemente al huésped, por lo que se necesita que su ingesta sea periódica para que persistan las propiedades promotoras de la salud (MacFarlane & Cummings, 1999).

Criterios de Selección de los Probióticos

Se ha fijado una lista de criterios para la selección de organismos probióticos y a su vez, se han estado sumando más, al mismo tiempo que el conocimiento del comportamiento huésped-microorganismo aumenta (Jonsson y Conway, 1992). Esencialmente, este criterio sugiere que la cepa debe ser segura, viable y metabólicamente activa dentro del tracto gastrointestinal, para que pueda beneficiar al huésped (Prasad y cols., 1998).

Origen de la cepa. Quizá en el aspecto taxonómico se puede encontrar una confusión para las personas no especializadas en el tema. Se puede elegir una cepa como es el caso de *L. acidophilus* la cual se puede aislar de distintas fuentes, incluyendo leche, porción baja del intestino de cerdos y rumen de bovinos. Si esta cepa se quiere aplicar a cerdos, solo debe seleccionarse la cepa aislada de cerdo porque esta es capaz de sobrevivir a las condiciones del tracto digestivo (sales biliares), el cual es su hábitat natural. Si se usa otra cepa de distinto origen, puede ser que no desarrolle su actividad y por lo tanto, no

crece en el nuevo medio ambiente, debido a que en su antiguo hábitat no necesitaba de sobrevivir a estas condiciones. Solo la cepa que esta adaptada a la vida en el intestino puede asegurar su actividad en ese medio (Hillman, 2001).

Organismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS). Los probióticos confieren beneficios al huésped por medio de compuestos microbianos y metabolitos que por lo regular son excluidos de la definición de probióticos (Ishibashi & Yamazaki, 2001). La introducción de un nuevo microorganismo dentro del grupo de probióticos implica el hecho de analizar estos compuestos y su actividad metabólica (Borriello y cols., 2003). Lo anterior orientado a su infectividad, patogenicidad, toxicidad y propiedades intrínsecas para poder ser considerado un organismo GRAS (Generalmente Reconocido Como Seguros). Aunque no se tiene una guía general aun del examen de seguridad de los probióticos, se puede determinar la seguridad de la bacteria usando animales experimentales y voluntarios humanos, así como métodos *in vitro* (Ishibashi & Yamazaki, 2001; Donohue y cols., 1998).

Los ensayos de patogenicidad e infectividad son un requisito, donde las bacterias candidatas no deben de poseer ninguna de estas características. Analizando este punto se puede comentar que las bacterias ácido lácticas así como las bifidobacterias han sido analizadas en el aspecto de seguridad y se encontraron con resultados negativos respecto a su patogenicidad (Borriello y cols., 2003). Aunque se pueden generar infecciones oportunistas en pacientes

inmunocomprometidos o bien por infecciones en áreas fuera de su hábitat para ambos géneros (Ishibashi & Yamazaki, 2001). Las bifidobacterias han sido involucradas en casos raros de infecciones oportunistas y en algunas de ellas se ha producido la muerte del paciente por reacciones secundarias a la infección (Miller-Catchpole, 1986b).

La actividad enzimática se determina como otro aspecto de seguridad en una bacteria. En este punto se analiza la actividad de las enzimas asociada con sustancias tóxicas. Los estudios en bacterias ácidos lácticas y bifidobacterias no reportan compuestos peligrosos. Los ácidos biliares secundarios son sustancias peligrosas carcinogénicas muy importantes, que son producidas por las bacterias intestinales en las secreciones corporales. Las bifidobacterias y los lactobacilos pueden deconjugar las sales biliares, aunque esta característica no es presentada en 5 especies de bifidobacterias y 15 de lactobacilos (Ishibashi & Yamazaki, 2001). La agregación en placa es otro requisito considerado en la prueba, la cual contribuye a una progresión de una endocarditis infectiva. Así como se analiza también la degradación del moco, cuya actividad no se encuentra producida por el género *Bifidobacterium* (Donohue y cols., 1998; Ishibashi & Yamazaki, 2001).

Resistencia a ácidos gástricos y sales biliares. Las cepas de probióticos deben ser capaces de sobrevivir y permanecer activo en el tracto digestivo (Dunne y cols., 2001). El tiempo de retención en el estomago e intestinos, así como el grado de mezcla del material ingerido y el lento paso por el intestino delgado,

pueden afectar la adhesión de estos microorganismos al epitelio intestinal (Jonsson & Conway, 1992). Los jugos gástricos en el estómago contienen moco, HCl, enzimas proteolíticas (Jonsson & Conway, 1992) y representan el primer mecanismo de defensa contra la mayoría de los microorganismos ingeridos (Dunne y cols., 2001).

Esta composición suele afectarse con el tipo de dietas, la edad del cerdo, el grado de mezcla del alimento y por la duración del mismo en el estómago. El pH varía según la porción de este órgano, siendo el antro pilórico el sitio de menor pH. En el cerdo recién nacido el pH es relativamente alto en el antro pilórico (5.2-5.9), bajando en los próximos 4-10 días de nacimiento hasta 4.1-4.4. En los cerdos adultos el pH es de 3.8-4.8 (Tabla 3). Las porciones acidificadas de la ingesta en el estómago, desembocan en el duodeno. En este sitio, el alimento se mezcla con la bilis y jugos pancreáticos los cuales tienen enzimas y sustancias buffer (Jonson & Conway, 1992).

Las cepas que son capaces de sobrevivir y llevar a cabo su metabolismo en presencia de los niveles fisiológico de sales biliares, sobrevivirá mejor el tránsito gastrointestinal (Percival, 1997).

En toda la porción del intestino el pH es más alto y tiende a ser menos variante y la diferencia entre cerdo lactante y adulto es mínima. En duodeno el pH varía de 2-6 y en el ileum es de 7.0 a 7.5 siendo las bacterias de la parte distal del intestino delgado quienes bajan el pH en esa región (Jonsson & Conway, 1992).

Tabla 3. Niveles de pH por porción de cada órgano intestinal de los cerdos.

Edad	Estómago	Intestino delgado		Ciego	Colon
		Parte anterior	Parte posterior		
		Neonato	4.0-5.9		
Lactante	3.0-4.4	6.0-6.9	6.0-6.8	6.8-7.5	6.5-7.4
Destetado	2.6-4.9	4.7-7.3	6.3-7.9	6.1-7.7	6.6-7.7
Adulto	2-3-4.5	3.5-6.5	6.0-6.7	5.8-6.4	5.8-6.8

Tomado de: Jonsson & Conway, 1992

El paso a través del intestino delgado es muy rápido (2.5 horas) y disminuye conforme va llegando al ano. Por lo tanto, para que la bacteria se pueda multiplicar es necesario que esta se adhiera al epitelio del intestino. Como el epitelio está constantemente regenerándose (cada 3-4 días), las bacterias pueden colonizarlo solo si la tasa de generación es mayor que la tasa de recambio celular (Jonsson & Conway, 1992). Sin embargo, hay estudios en los que se ha comprobado que las bacterias en especial las bifidobacterias se ven afectadas en sus receptores de membrana de manera no reversible al ser expuestas a sales biliares, impidiendo su adhesión a las células epiteliales (Gómez-Zavaglia y cols., 2002). Sin embargo, otras investigaciones han indicado lo contrario, donde las bifidobacterias se ven dañadas en su membrana pero de manera reversible (Ibrahim & Bezkorovainy, 1993).

Antagonismo bacteriano. Los mecanismos de competición exclusiva son hasta ahora desconocidos pero se le ha asociado con factores como pH, ácido sulfhídrico, bacteriocinas, ácidos grasos, ácidos biliares deconjugados, competencia por nutrientes y por los sitios de adhesión al epitelio intestinal. Esta última es la que se sugiere como el mecanismo mas probable debido a que la respuesta se define dentro de las 2 horas de la infección, tiempo de respuesta fuera de la posibilidad de la respuesta inmune (Fuller, 1999; Doyle, 2001).

Se ha observado que el género *Bifidobacterium* es mas inhibitorio contra *E. coli* y *S. choleraesuis* que *Lactobacillus*, debido a que estos producen ácido

láctico y además ácido acético, el cual es más inhibitorio que el primero, pero juntos dan una acción sinérgica (Percival, 1997). Esta inhibición se da básicamente por el grado de disociación de este ácido, el cual tiene un PK de 4.75, mientras que el ácido láctico tiene el pK de 3.08. Cuando se encuentra el pH a 4, el ácido acético se encuentra en un 11% no disociado, mientras que el ácido láctico se encuentra en un 85%. Esta característica le da la posibilidad al ácido acético de penetrar con más facilidad la célula por encontrarse la molécula de ácido en su forma neutral y por ser liposoluble. La entrada de estos ácidos a la molécula provoca un desequilibrio en el gradiente de protones, disminuyendo el pH del citoplasma, inhibiendo con ello el crecimiento de la célula. Pero hay otras investigaciones que sugieren que no es el protón el que causa la muerte de la célula, sino que son los aniones. Estos investigadores proponen que el hecho de tener una acumulación de aniones en el citoplasma, se reduce la tasa de síntesis de macromoléculas y afecta el transporte sobre la membrana celular (Ouwehand, 1998).

Aparte de producir este tipo de ácidos grasos de cadena corta, las bifidobacterias producen ácido propiónico, ácido butírico y ácido fórmico (Percival, 1997). Además de que este género produce unas sustancias inhibitorias a las que se les ha llamado "bifidinas" y "bifilong" y otras bacteriocinas activas contra algunas especies Gram positivas (O'Riordan & Fitzgerald, 1998).

Cuando se trabaja con estos tipos de microorganismos antagónicos, se debe tomar muy en cuenta el tiempo de vida de las cepas, debido a que con el

tiempo pierden la eficacia antagónica. Esto se debe a que las bacterias se adaptan muy fácilmente al medio en el que se siembra y si no se encuentran en constante competencia como en el medio ambiente intestinal, pierden algunas capacidades que a su vez son pérdidas de energía para la célula. Ejemplo de ello es la producción del inhibidor activo contra un competidor ausente. Por lo tanto, en cada resiembra, la proporción de las cepas no inhibidoras aumenta (Hillman, 2001).

Los Probióticos Como Alternativa al Uso de Antibióticos Promotores de Crecimiento

Actualmente el Estado de Sonora tiene el segundo lugar a nivel nacional en producción de carne de cerdo de calidad (SAGARPA, 2003). El riesgo de las pérdidas económicas causadas por la disminución de peso y el deterioro de la salud del animal, son de gran importancia y se han hecho grandes esfuerzos para encontrar la solución para mejorar la producción (Jonsson y Conway, 1992).

Se sabe que el desarrollo y salud del tracto gastrointestinal son un factor importante de la productividad de todos los animales de granja (Anderson y cols., 1999). En animales saludables, la microbiota tiende a estar en balance en la que los microorganismos se encuentran en una proporción adecuada. Pero la privación de los alimentos y/o agua, desplazamientos, y estrés entre otros, desestabiliza el sistema, desembocando en una infección por favorecer el crecimiento de patógenos (Garriga & Hugas, 2000).

En algunas investigaciones se ha propuesto que al alimentar a los animales con antibióticos se puede revertir la depresión del crecimiento promovida por los microorganismos patógenos. Para esto, se han contemplado los costos reducidos por el mantenimiento del sistema gastrointestinal por el uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento (Anderson y cols., 1999).

Sin embargo, el peligro de la transferencia de resistencia bacteriana a los antibióticos se encuentra considerado de alto impacto en la salud en los animales (Close, 2000; Feinman, 1998). Este punto ha sido analizado por las distintas instituciones en la Unión Europea en las que hay controversias por la prohibición de estos promotores de crecimiento (Pérez, 2002).

En octubre del 2002 se publicó la lista de los antibióticos permitidos en porcinos: avilamicina, flavomicina y la salinomicina que son antibióticos no homólogos en medicina humana y veterinaria. Sin embargo, en el 2001 se solicitó su prohibición al Comité Permanente de la Comisión Europea (Pérez, 2002; Doyle, 2001). Esta restricción ha creado un vacío que los probióticos empiezan a llenar debido a que son microorganismos que han sido incluidos en alimentos por muchos años, sin causar efectos adversos y porque están presentes naturalmente en la flora intestinal (Close, 2000; Fuller, 1999; Mulder y cols., 1997). Esto se debe a que un probiótico puede promover el balance en la flora intestinal (Fuller, 1989; Nousiainen & Setälä, 1993; Mulder y cols., 1997).

El empleo de los probióticos en animales ha sido practicado desde hace 30 años (Garriga & Hugas, 2000; Ballongue, 1998; Fuller, 1999), pero en la

actualidad se ha generado un renovado interés acerca de las bifidobacterias como aplicación probiótica, por lo que se ha producido un intenso estudio en éstas (Hoover, 2000; Hillman, 2001). Mucha de la información sobre los ensayos con probióticos deriva de pruebas experimentales realizadas por organizaciones comerciales productoras de probióticos, que en algunos casos sus publicaciones no son aceptadas en revistas reconocidas (Fuller, 1999). Todo esto da motivo a crear una perspectiva falsa acerca de los probióticos, pero por otro lado hay muchos estudios que han probado la eficacia de los probióticos en animales (Hillman, 2001).

El uso de los probióticos ha manifestado variaciones en la respuesta benéfica (Garriga & Hugas, 2000; Doyle, 2001; Fuller, 1999). Estas inconsistencias han sido probablemente provocadas por la escasa viabilidad, inapropiada administración, utilización de organismos erróneos para el animal y para la condición que se está tratando entre otros factores. El tener presente estos puntos pueden ayudar a establecer una respuesta probiótica óptima de las preparaciones existentes reflejada en la economía de la granja (Garriga & Hugas, 2000). Aunque se ha observado que los efectos benéficos de estos microorganismos es más pronunciado en condiciones no óptimas de higiene como en el caso de los antibióticos (Doyle, 2001).

Beneficios de los Probióticos en Animales

Los beneficios que los probióticos pueden brindar son muchos y muy variados (Tabla 4). Entre los beneficios son que han sido involucrados en una variedad de protección contra patógenos tales como *E. coli*, *Salmonella* y *Clostridium* los cuales son patógenos potenciales del cerdo en la etapa de destete (Fuller, 1999; Mulder y cols., 1997). Además no generan resistencia a los antimicrobianos lo cual puede comprometer una terapia. Así mismo, no producen productos ni residuos tóxicos en la carcasa (Fuller, 1989). También se ha observado que la tasa de crecimiento de los animales se ve aumentada con una mejor conversión del alimento (Jonsson & Conway, 1992).

Los probióticos pueden ser administrados en varias formas, entre las que se encuentran el sumar directamente a los alimentos el sedimento del crecimiento de las bacterias, así como ingerirlos en cápsulas, pastas, polvo o gránulos. También se puede administrar una cepa de determinada especie, o bien una mezcla en la que se emplea de dos hasta ocho cepas distintas de bacterias en una formulación probiótica. Las mezclas comerciales por lo general poseen lactobacilos y estreptococos y muy rara vez bifidobacterias (Fuller, 1989). Al utilizar un probiótico multicepa se puede asegurar un amplio espectro de acción, así como su uso en varias especies de animales y frente a un rango de condiciones adversas, entre las que se encuentran infecciones bacterianas y depresión del crecimiento por el uso de antibióticos (Garriga & Hugas, 2000; Fuller, 1999).

Tabla 4. Beneficios potenciales de los probióticos para los animales de granja.

1. Resistencia a enfermedades
 2. Aumento en la tasa de crecimiento
 3. Mejor conversión alimenticia
 4. Digestión mejorada de ácidos fílicos, glucosinolatos, inhibidores de tripsina
lectinas y fibra dietaria.
 5. Mejor absorción de nutrientes
 6. Provisión de nutrientes esenciales
 7. Mejora en la calidad de la carcasa y menor contaminación
 8. Estimulación de la respuesta inmune no específica
-

Fuller, 1999; Mulder y cols., 1997

El rango de administración varía entre 10^6 y 10^{12} según la edad del cerdo (Tortuero y cols., 1995; Abe y cols., 1995; Jonsson & Conway, 1992; Pollmann y cols., 1980; Jurgens y cols., 1997; Rangel, 1994). No se debe administrar en cantidades excesivas que puedan causar problemas digestivos (Jonsson & Conway, 1992). En este último punto, la edad del animal se debe tomar en cuenta debido a que entre más tempranamente se implemente (recién nacidos) se puede asegurar su recepción en el intestino porque aún no está estable la microbiota de un neonato (Garriga & Hugas, 2000; Fuller, 1999).

A nivel inmunológico. Los cerdos nacen sin inmunoglobulinas, siendo después del parto, cuando adquieren su inmunidad pasiva (Gómez y cols., 1998; Candia, 1996). Esto les da la característica de ser inmunocompetentes más tarde que a otras especies. Los linfocitos B llegan a estar en las mismas concentraciones séricas que en los animales adultos a los 30 días después del nacimiento, manteniéndose por 9 días después del destete (Candia, 1996). Sin embargo, los cerdos pueden empezar su producción de inmunoglobulinas a los 10 días de edad, siendo la IgM la primera en sintetizarse (Gómez, 2001), y pequeñas concentraciones de IgA (Wilson, 1974). Se sabe que las inmunoglobulinas que produce el cerdo son solamente IgG, IgA, IgM e IgE, porque aun no se ha demostrado la presencia de IgD en ellos (Gómez, 2001).

La protección del calostro de las cerdas dura las primeras 48 horas y después es la leche la que proporciona la protección. Teubner (2002), menciona que la protección del calostro puede durar hasta 10 a 14 días para

después ser continuada con la leche. El calostro de las cerdas generalmente tiene distintas concentraciones de inmunoglobulinas en relación con la leche (Tabla 5), estos valores pueden variar dependiendo de la raza, alimento y tipo de técnicas utilizadas. Esto le confiere al animal, primero protección a enfermedades sistémicas y después contra enteropatógenos (Wilson, 1974). Las inmunoglobulinas tienen su vida media en circulación, de 21 días para la IgG, 4 días para la IgM y 2.5 días para la IgA (Morilla, 1989).

La Tabla 6 muestra la concentración de IgA a partir de los dos días de nacidos hasta los 2 años de edad. Allí se puede observar que al inicio el calostro proporciona una gran cantidad de IgA, la cual va disminuyendo conforme pasa el tiempo, para después aumentar debido a la producción propia del animal (Teubner, 2002).

El sistema inmune asociado a la mucosa es la primera barrera de defensa que tiene el organismo contra los patógenos u otros antígenos de la dieta. Esta se encuentra situada bajo la última capa celular de la mucosa. Las inmunoglobulinas secretadas por este tejido son principalmente las IgA e IgG (Nousiainen & Setälä, 1993). Los linfocitos producen las inmunoglobulinas del tipo A (en forma dimérica), en la región linfoide de las placas de Peyer. Esta forma dimérica es enlazada por un péptido de cadena "J", el cual se une al receptor de la mucina conocido como componente secretorio para formar una capa protectora en la mucosa. Se ha hipotetizado que estas inmunoglobulinas son activadas por antígenos locales cerca de la superficie de la mucosa (Nousiainen & Setälä, 1993).

Tabla 5. Concentración de inmunoglobulinas en el calostro y leche de cerdas.

Líquido	Inmunoglobulinas (mg/dl)		
	IgA	IgM	IgG
Calostro	950-1050	250-320	3000-7000
Leche	300-700	30-90	100-300
Suero	50-500	100-500	1700-2900

Tomado de: Tizzard, 2000

Tabla 6. Concentración de IgA en suero en cerdos a distintas edades.

Edad	IgA (mg/dl)
2 días	430±160
3 semanas	20 ± 10
6 semanas	40 ± 10
9 semanas	70 ± 20
12 semanas	130 ± 40
15 semanas	130 ± 60
18 semanas	220 ± 80
21 semanas	220 ± 80
24 semanas	210 ± 90
2 años	210 ± 40

Tomado de: Teubner, 2002

Además se ha observado que las bacterias propias del huésped interactúan con los receptores mucina-anticuerpo proporcionando una barrera de defensa más fuerte contra los patógenos. Lo que no se sabe es como el organismo puede diferenciar entre bacterias silvestres y bacterias patógenas y se ha especulado que la microflora normal tiene antígenos en común con el huésped (Nousiainen & Setälä, 1993). Los ácidos lipoteicoicos de las bacterias Gram positivas como las bifidobacterias, poseen una alta afinidad por la membrana de las células epiteliales y pueden servir también como acarreador de otros antígenos, enlazándolos a tejido blanco, provocando una reacción inmune (MacFarlane & Cummings, 1999).

Los mecanismos de protección de los probióticos contra los patógenos es poco conocido, pero se sabe que en roedores puede aumentar significativamente la respuesta inmune asociada a la mucosa y sistémica (Fuller, 1999). Como los resultados que produjeron las bifidobacterias *in vivo*, con ratones en los que se indujo la producción de IgA (MacFarland & Cummings, 1999).

En trabajos realizados con probióticos, se han encontrado que cepas de bacterias ácido lácticas al ser expuestas a *E. coli* en cerdos, aumentan los niveles séricos de IgG (Jonsson & Conway, 1992). Así mismo, se ha observado que las IgA también se ven incrementadas al ser administradas las bacterias probióticas junto con *Salmonella typhimurium* (Nousiainen & Setälä, 1993).

Los macrófagos y las células T citotóxicas son las que se encargan de las respuesta inmune mediada por células en el intestino (Nousiainen & Setälä,

1993). En animales convencionales con una flora completa se ve incrementada la actividad fagocítica y los niveles de inmunoglobulina comparados con los animales gnotobióticos, y lo mismo se observó en humanos (Fuller, 1989; Nousiainen & Setälä, 1993). Por otro lado, la administración de bifidobacterias induce el factor necrótico de tumor α (TNF- α) y la interleucina-6 (IL-6) en humanos. Con esto los investigadores afirman que las bacterias ácido lácticas y las bifidobacterias estimulan la inmunidad sistémica (Isolauri y cols., 1998).

En resumen, los probióticos interactúan con el sistema inmune en muchos niveles, incluyendo la producción de citoquinas, proliferación celular de mononucleares, fagocitosis por macrófagos y la modulación de la autoinmunidad e inmunidad y muerte hacia los patógenos bacterianos y protozoarios (MacFarland & Cummings, 1999).

A nivel ambiental. Los olores que se despiden en granjas porcícolas son muy característicos e incómodos para la comunidad, la cual comúnmente se queja de la devaluación de la propiedad y del aumento de insectos y roedores. Estos ambientes pueden ser dañinos también para los granjeros donde el sulfuro de hidrógeno puede provocar un paro respiratorio instantáneo y muerte por remover el estiércol líquido en grandes fosas. El polvo contiene hongos, bacterias, alimento animal, fluidos y excretas de animales. El amoníaco también puede producir daños. Se genera también monóxido de carbono, el cual puede causar problemas respiratorios. Al igual que en los humanos, los animales son

también víctimas de su propio desecho, lo cual se traduce en pérdidas económicas para la granja. Para controlar parte de este problema se han propuesto el utilizar bacterias ácido lácticas porque reducen la emisión de amoníaco hasta en un 80% (Rodríguez, 2002).

A nivel fisiológico. La pared del intestino esta formada de mucosa en pliegues, proyectada en forma de dedos (vellosidades), la cual esta conectada a los enterocitos absorbentes o células secretoras de moco. Entre las vellosidades existen las criptas de Lieberkühn, donde proliferan las células epiteliales, extendiéndose debajo de la lámina propia. En la migración de estas células proliferadas hacia las criptas de las vellosidades, las células globosas de la mucosa se diferencian y maduran, incrementando las enzimas digestivas en ese proceso (Nousiainen & Setälä, 1993).

La presencia de la microflora causa muchos cambios en la fisiología y morfología del animal. El tracto digestivo es mas delgado y con más pliegues de vellosidades en animales libres de microorganismos, también tienen una lámina propia más reducida y los tiempos de renovación celular son más largos, así como más altas las actividades de las enzimas digestivas. Al ser comparado con animales alimentados con lactobacilos, se pudo observar cambios significativos en la misma y una tasa de recambio de las células epiteliales aumentada (Nousiainen & Setälä, 1993) y la permeabilidad de las células afectadas, incrementando la ingesta de nutrientes (Doyle, 2001).

El tubo digestivo es el portal a través del cual entran nutrientes, fluidos, y electrolitos en el cuerpo. En los cerdos esta constituido por boca, faringe, el canal alimentario y distintas glándulas accesorias. El canal alimentario está compuesto de esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso. Las glándulas accesorias se encuentran localizadas en la región de la cabeza como las salivales, y dentro del abdomen el hígado y páncreas. Estas glándulas están asociadas con el canal alimentario, liberando sus excreciones en la luz intestinal. El intestino delgado se divide en tres secciones: duodeno, yeyuno e ileon. En los cerdos de término, el intestino delgado mide entre 16 y 21 m de longitud, mientras que en cerdos recién nacidos, mide de 2 a 4 m. El intestino grueso tiene tres porciones: ciego, colon y recto, en cerdos de término, el colon llega a medir de 3.5 a 6 m de longitud, correspondiendo de 7 a 8 % de ciego. El ciego es un saco cilíndrico localizado en la parte terminal proximal del colon. Las capas de la mucosa del ciego y colon no tienen vellosidades, pero existen pequeñas proyecciones cortas de epitelio columnar, con un borde estriado formado por microvellosidades, las cuales no contienen enzimas digestivas. Existen numerosas células globosas esparcidas a lo largo del epitelio columnar, las cuales excretan un complejo de proteínas y carbohidratos sulfatados que actúa como lubricante. El recto también posee epitelio columnar alto y células globosas, pero en menor proporción, mientras que en el ano, no hay células mucosas (Yen, 2001).

La pared del intestino delgado consiste en cuatro principales capas: la mucosa, constituida por tres subcapas llamadas muscularis de la mucosa,

lámina propia y epitelio. La submucosa está formada por tejido conectivo denso con células dispersas; la subcapa muscular constituida por fibras musculares lisas y por último, la serosa que es una extensión del peritoneo. La lámina propia está constituida por vasos sanguíneos, linfocitos libres y nódulos linfáticos (Placas de Peyer). La lámina propia soporta la estructura de la capa epitelial y nutre el epitelio (Yen, 2001). El epitelio está compuesto de células columnares, denominadas enterocitos con función absortiva y secretora. La capa epitelial cubre las vellosidades intestinales, las cuales son proyecciones de la mucosa en forma de dedos, de guantes o de hojas. Cada vellosidad tiene en el interior de su lámina propia un vaso linfático, el cual se une al resto de los vasos linfáticos de la mucosa y también en la lámina propia hay vasos sanguíneos (arteriola y vénula). Las células epiteliales que caducan son expulsadas a la luz intestinal en el ápex de la vellosidad. Este proceso lleva tres días, por lo que la renovación del epitelio intestinal es constante, siendo este proceso el más rápido del organismo (Riverón, 1999).

A nivel patológico. Las infecciones entéricas pueden ser consideradas en base al grupo de edad afectado donde se toman en cuenta lechones desde el pre y post destete, engorda y finalizadores (Thomson, 2002).

Los aspectos de edad, genética y dieta juegan un papel muy importante en el desarrollo de las propiedades de los receptores intestinales. La glicosilación de los receptores de las paredes intestinales son importantes para el reconocimiento, tanto de patógenos como de bacterias de la flora normal del

huésped (Thomson, 2002). Las cepas de *E. coli* pueden causar diarrea en cerdos recién nacidos y su incremento puede ser debida a la disminución de las bacterias ácido lácticas (Doyle, 2001). Esta diarrea puede ser clasificada en base a sus adhesinas fimbriales (K88, K99, 987P, F41) y las enterotoxinas, las cuales son importantes factores de virulencia que pueden competir exitosamente con los comensales (Stewart y cols., 1993).

La *E. coli* K88 enterotoxigénica es la principal causante de diarrea en los cerdos (Stewart y cols., 1993). Las resistencias heredables para esta bacteria en los cerdos se deben a un gen autosómico recesivo por un fracaso en la expresión del receptor sobre la fimbria de adhesión en el borde de las membranas epiteliales. Se ha observado que las bacterias prebióticas, en especial los lactobacilos, producen un compuesto de alto peso molecular el cual reduce la adhesión *in vitro* de la *E. coli* K88 por menos del 50% por bloqueo esteárico de los receptores de membrana (Ouwehand, 1998). Solo el 50% de los lechones genéticamente comunes heredan la resistencia para este organismo y tienen un efecto significativo sobre las pérdidas económicas en infecciones por *E. coli*. En resumen la susceptibilidad frente a estas infecciones es dominante sobre las resistencias (Stewart y cols., 1993).

En estudios que se han hecho con probióticos se ha demostrado la eficacia que tienen estos microorganismos (lactobacilos, bifidobacterias y enterococos) contra este patógeno, cuyo mecanismo está relacionado con la adhesión al epitelio intestinal (Fuller, 1989). Pero el movimiento peristáltico y la secreción de fluidos por las bifidobacterias puede bloquear la adhesión e

invasión de muchos enteropatógenos y uropatógenos (Ouwehand, 1998). Así mismo el género *Bifidobacterium* ha manifestado resistencia a la colonización de patógenos en el intestino grueso (MacFarlane & Cummings, 1999).

Salmonella sp es un potente patógeno para los cerdos, generándoles diarreas severas. La especie de *S. choleraesuis* es antibioticorresistente en especial a las tetraciclinas, lo que hace más difícil su erradicación. Otra causa de la persistencia de esta bacteria es por la reinoculación vía heces (Stewart y cols., 1993).

Explotación en los Sistemas de Producción de Granjas Porcícolas.

Las granjas porcícolas son excelentes fuentes de empleo y generación de divisas para el país, por consiguiente esta producción en el país lleva una trayectoria ascendente (Montijo, 1995). Este fenómeno es apoyado principalmente por los estados de Guanajuato, Sonora, Jalisco y Puebla y por cooperativas de productores que procesan la carne en alimentos de distintos tipos (Montijo, 1995). De estos estados, Sonora ocupa el segundo lugar en producción de carne (SAGARPA, 2003). El desarrollo de esta producción en Sonora es relativamente reciente, se inicia en la década de los sesenta, se incrementa en los sesenta y ochenta con una destacada mejora tecnológica y acelerado crecimiento de la producción (Feuchter, 2000; Montijo, 1995). Prueba de ello es que según estadísticas realizadas en el país, en la década de los noventa se pudo apreciar que Sonora fue el único estado que se pobló de

cerdos en los 30 años que tiene en la producción (Censo Agrícola-Ganadero y Ejidal, 1960; VII Censo Agropecuario, 1991).

Los porcicultores en Sonora están organizados a nivel privado y a nivel ejidal. A nivel privado se encuentran 4 asociaciones locales de porcicultores localizados en Cajeme, Hermosillo, Navojoa y Huatabampo, quienes representan a la Unión Ganadera Regional de Porcicultores de Sonora. Esta organización les permite estar coordinados en cuestiones de gestoría, adquisición de granos forrajeros y pastas alimenticias que se utilizan en el balanceo de raciones. También se les facilita de esta manera el proceso de comercialización del producto y subproducto del cerdo. A nivel ejidal, la agrupación está representada por Asociaciones Rurales de Interés Colectivo lo cual les permite a los ejidatarios integrarse al sector productivo del Estado. También les facilita conseguir organizadamente recursos económicos así como la comercialización de cerdos (Montijo, 1995).

Sonora cuenta hasta ahora con un sistema de producción intensivo de granjas, una infraestructura para la cría y explotación del cerdo muy variado, pues cuenta con granjas productoras de pie de cría de excelente calidad, plantas empacadoras de productos y subproductos del cerdo, grandes extensiones agrícolas, bodegas para almacenamiento de granos e insumos, plantas dedicadas a la elaboración de alimentos balanceados, además de rastros altamente tecnificados y sofisticados de Tipo Inspección Federal (TIF) para la matanza de cerdos y bovinos (Montijo, 1995).

El avance tecnológico que ha tenido este Estado le ha permitido ser considerado zona libre de cólera porcino, debido a que no dependen de la adquisición de lechones de otros estados del país (Feuchter, 2000). También porque es el único Estado que cuenta con leyes de clasificación, regulación y reglamentación de cortes para carne de res y puerco. Esto le ha permitido comercializar cerdo en pie y en canal tanto dentro del país como para Estados Unidos y otros países (Montijo, 1995; Campos, 1993). Esto ha obligado a los productores del estado, a realizar modificaciones casi radicales en la crianza de estos animales (Montijo, 1995). Las modificaciones fueron desde aspectos genéticos, zootécnicos, nutricionales, sanitario, económicos, de instalaciones, equipo y administrativo (Feuchter, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de la Bifidobacteria

Se procedió a tomar muestras de intestinos de cerdos sanos recién sacrificados, provenientes de una planta tipo inspección federal (TIF). Estas muestras fueron depositadas en bolsas estériles con medio de transporte Stuart y colocadas en hielo para su transporte hasta las instalaciones del laboratorio de Microbiología Molecular del Centro de Investigación y Alimentación y Desarrollo, A.C.

Las muestras fueron maceradas en un masticador (Masticator IUL instruments) para la liberación de células adheridas al epitelio y la homogenización de las muestras. Se tomaron muestras del homogenizado en el medio de transporte Stuart, así como de las paredes intestinales raspando la superficie para obtener un inóculo representativo del trozo intestinal. El inóculo fue depositado en caldo MRS enriquecido con los ingredientes recomendados por Corona, (2001) para el aislamiento primario. Se incubaron a 37°C por 48 horas en anaerobiosis, proporcionada por la jarra anaeróbica y una bolsa Gaspak para ambiente anaerobio.

El cultivo fue sembrado en placas con agar MRS y agar TPY suplementado con los mismos ingredientes indicados anteriormente. Se incubó de igual forma que los tubos de caldo de enriquecimiento. Se separaron las colonias que mostraban un aspecto similar a las colonias de bifidobacterias.

Estas colonias se sembraron por separado en placas con agar MRS y TPY⁴³ respectivamente y fueron incubados en condiciones aeróbicas.

Las cepas que mostraron características anaeróbicas se escogieron para teñirlas con los colorantes de Gram para ver su morfología microscópica. Solo las cepas que presentaron similitudes morfológicas con las bifidobacterias fueron seleccionadas (Ibrahim & Salameh, 2001).

Prueba de la Presencia de la Enzima F6PPK

Las cepas seleccionadas por características anaerobias y morfología bifida fueron sembradas en caldo TPY e incubadas en las condiciones originales de cultivo. Al crecimiento se le determinó la presencia de la enzima fructosa 6-fosfato-fosfoacetolasa, por el método de Scardovi, (1986) modificado por Orban & Patterson, (2000).

Biotipificación

Las cepas identificadas en base al género se identificaron por fermentación de azúcares, para determinar su especie. En este análisis se procedió a preparar caldo TPY sin glucosa. El azúcar adicionado a este medio tuvo una concentración final del 1%. Se trabajó con placas ELISA para depositar los caldos con los respectivos carbohidratos (Figura 1). Se inocularon estos caldos (180 μ L) con las respectivas cepas (20 μ L). Se taparon los pocillos con aceite mineral estéril y posteriormente fueron incubados en condiciones

anaerobias. En total fueron 16 azúcares, 2 aminoácidos y 2 alcoholes los utilizados para este estudio (Tabla 7). Los resultados fueron comparados por las pruebas de fermentación proporcionadas por Ballongue (1998).

Prueba de resistencia a pH bajos

Determinación Cualitativa

En esta prueba se tomaron las cepas sembradas en caldo TPY para exponer su sedimento a la acción de pH bajo (3.0). Posteriormente se inocularon por estrías a placas con agar TPY pH 6.0 e incubadas por 24 horas a 37°C en condiciones anaerobias. Se llevó a cabo un control de la cepa en caldo TPY a pH 6.0, el cual fue sembrado de la misma manera en placas con agar TPY. Las cepas con el mejor crecimiento en las estrías, fueron seleccionadas para determinar cuantitativamente la resistencia a pH 3.

Determinación Cuantitativa

Se expuso a las cepas seleccionadas a pH 3.0 en las mismas condiciones que la prueba cualitativa, con la diferencia de que después de exponer al probiótico frente al ácido se hicieron diluciones seriadas 1:10 para ser sembrado por duplicado en agar TPY, por placa vaciada a pH 6.0. Las el

Tabla 7. Características de fermentación de las especies de bifidobacterias.

Microorganismo	D-ribosa	L-arabinosa	Lactato	Celobiosa	Melezitosa	Rafinosa	Sorbitol	Almidón	Gluconato	Xilosa	Manosa	Fructosa	Galactosa	Sucrosa	Maltosa	Trehalosa	Melibiosa	Manitol	Salicina
<i>B. bifidum</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	✓	-	-	✓	-	-
<i>B. longum</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	✓	✓	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. infantis</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	✓	✓	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. breve</i>	+	-	+	✓	✓	+	✓	+	+	-	+	+	+	+	+	✓	+	✓	+
<i>B. adolescentis</i>	+	+	+	+	+	+	✓	+	+	+	✓	+	+	+	+	✓	+	✓	+
<i>B. aneurulatum</i>	+	+	+	-	-	+	✓	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. catenulatum</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	✓	+	+	+	+	+	+	✓	+	✓	+
<i>B. pseudocatenulatum</i>	+	+	+	✓	-	+	✓	+	✓	+	+	+	+	+	+	✓	+	✓	+
<i>B. dentium</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. elobosum</i>	+	✓	+	-	-	+	-	+	-	✓	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>B. pseudolongum</i>	+	+	✓	✓	✓	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. cuniculi</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. choerinum</i>	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. animalis</i>	+	+	+	✓	✓	+	-	+	-	+	✓	+	+	+	+	✓	+	-	+
<i>B. thermophilum</i>	-	-	✓	✓	✓	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	✓	+	-	✓
<i>B. boum</i>	-	-	✓	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>B. magnum</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. pullorum</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>B. suis</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	✓	✓	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. minimum</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>B. subtile</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	✓	+	-	✓
<i>B. coryneforme</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>B. asteroides</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	✓	+	-	+	✓	+	✓	-	+	-	+
<i>B. indicum</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	✓	+	✓	+	✓	-	+	-	+

Ballongue, 1998

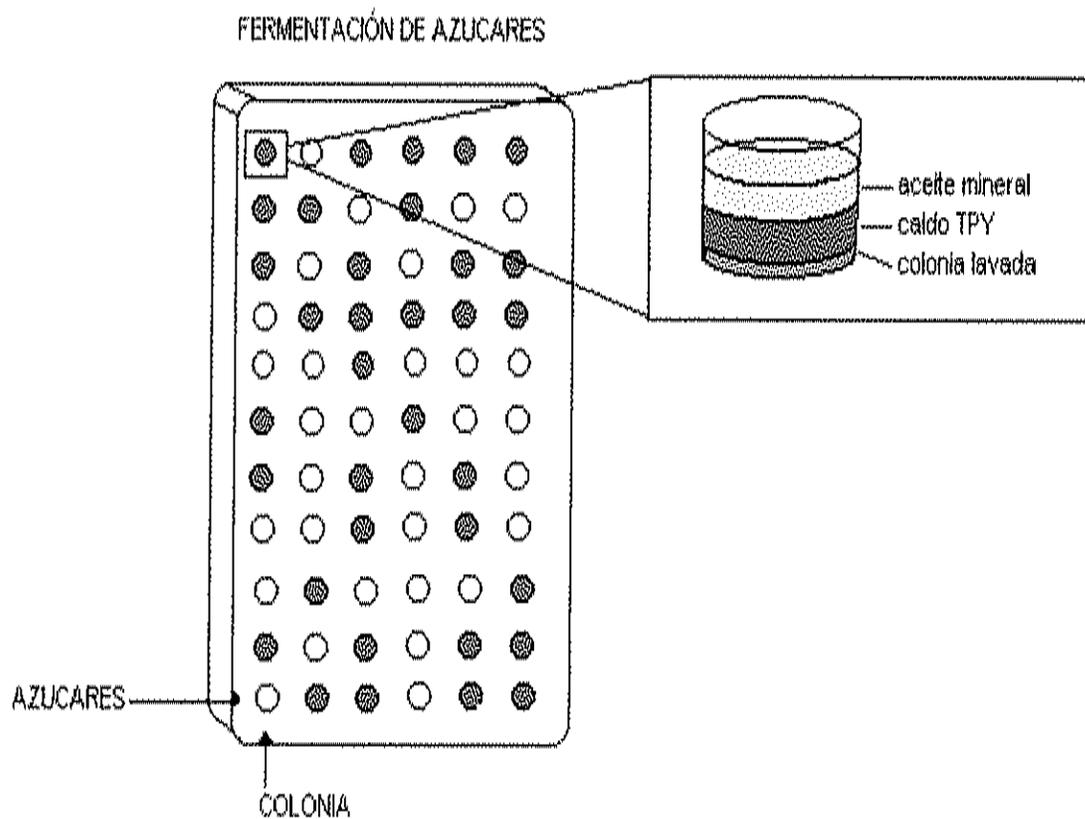


Figura 1. Esquema representativo de las pruebas de fermentación en microplacas de ELISA, utilizadas en la identificación de especies de *Bifidobacterium*.

placas se incubaron a 37°C por 24 horas en condiciones anaerobias. Se contaron aquellas placas que tuvieran entre 25 y 300 UFC/mL y se determinó el porcentaje de sobrevivencia, tomando en cuenta el control de la cepa, la cual fue sembrada de igual forma que el tratamiento previo con el ácido y se calculó el porcentaje de resistencia con la ecuación desarrollada por Gómez-Zavaglia (1998).

$$\% \text{ de sobrevivencia} = \frac{\text{UFC/ml (bacterias expuesta al pH 3.0)} \times 100}{\text{UFC/ml (bacterias testigo)}}$$

Prueba de Resistencia a Sales Biliares

Determinación Cualitativa

Para esta determinación se sembró la bacteria en 10 mL de caldo TPY. Del crecimiento se tomaron alícuotas de la siembra para inocularlas en una placa con agar TPY con 0.5% de sales biliares porcinas a pH 6.0. Se tomó otra muestra de la misma cepa para sembrarla por estria en una placa con agar TPY sin sales biliares, como control. Se incubaron las placas a 37° C por 24 horas en anaerobiosis. Se observó el crecimiento de las cepas en estas placas para determinar objetivamente la resistencia a las sales biliares. Las cepas que mostraron buen crecimiento en las placas con sales biliares, se seleccionaron para analizar la resistencia cuantitativa a estas sales biliares.

Determinación Cuantitativa

Del crecimiento en caldo TPY de las cepas seleccionadas en el paso anterior se hicieron diluciones seriadas 1:10 para inocular 1mL, por placa vaciada, en agar TPY, adicionado con sales biliares porcinas (0.5%). La incubación de las placas fue la misma ya descrita en la prueba cualitativa de resistencia a las sales biliares. En las placas cuya dilución alcanzaba el crecimiento entre 25 y 300 UFC/mL fueron escogidas para su conteo en la placa. Hubo un control de las cepas sembrado en placas sin sales biliares. El porcentaje de sobrevivencia se determinó con el número de cepas resistente con respecto al control, utilizando la ecuación diseñada por Gómez-Zavaglia (1998).

$$\% \text{ de sobrevivencia} = \frac{\text{UFC/ml (bacterias expuesta al pH 3.0)} \times 100}{\text{UFC/ml (bacterias testigo)}}$$

Antagonismo Bacteriano

En esta determinación las cepas fueron sembradas en caldo MRS e incubadas por 24 horas en anaerobiosis a 37°C. Así mismo, se sembraron las cepas patógenas en caldo BHI (Infusión Cerebro-Corazón). Los patógenos fueron *E. coli* K88 y *S. choleraesuis*. Las cepas patogénicas fueron ajustadas con el tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland, para inocular 100 µL por placa vaciada en agar MRS. Al agar inoculado con el patógeno se le hicieron pocillos

con una pipeta Pasteur, para inocular 80 μ L del sobrenadante del probiótico, previamente esterilizado por membrana (0.25 μ m, Nalge Co., Rochester, NY). Las placas con el sobrenadante fueron incubadas sin invertir a 37° C en aerobiosis por 24 horas. El halo de inhibición fue medido en milímetros (González y cols., 1993). Las cepas con los mejores halos de inhibición fueron elegidas para analizar el porcentaje de antagonismo bacteriano, frente a bacterias del mismo género y de igual o distinta especie.

Antibiograma

El análisis de sensibilidad a los antibióticos fue determinado a las cepas que finalmente cumplieron con los criterios de selección definidos en este trabajo. Se procedió a sembrar las cepas en 10 mL de caldo MRS por 18 horas a 37° C en condiciones anaerobias. El crecimiento se ajustó con el nefelómetro de McFarland número 0.5 y se sembró de forma masiva con hisopos en agar MRS modificado (Roy & Ward, 1990). Posteriormente se depositaron los discos de antibióticos (nitrofurantoina, 100 μ g; eritromicina, 15 μ g; tetraciclina, 30 μ g; amoxicilina, 10 μ g; cloranfenicol, 30 μ g; y penicilina, 10 IU) en el medio de cultivo. Las placas se invirtieron y fueron incubadas a 37° C por 18 horas en condiciones anaerobias. Los halos de inhibición se midieron en milímetros (Velázquez & Feirtag, 1997).

Estudio *in vivo*

Animales y Manejo

El estudio *in vivo* fue realizado en una granja comercial. Se utilizaron lechones de dos días de edad. Los lechones se mantuvieron con sus madres y se identificaron por medio de tatuajes en la oreja. Durante el transcurso del experimento no hubo medicación para los lechones y las madres. Los lechones solamente se alimentaron con calostro y leche de la madre *ad libitum*. Se llevó un control diario de las incidencias de diarrea.

En utilizaron un total de 147 lechones distribuidos en 17 camadas, de estos, 9 fueron controles, y 9 tratados con la mezcla bifidobacterias. El número de partos fue considerado de manera que no fuera mayor que 5 y que en ambos tratamientos fueron similares en promedio.

Toma de Muestras

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular de los lechones (Figura 2) en los días 2, 11 y 21 para determinar IgA e IgG. Los días 8 y 21 se sacrificaron dos animales para la toma de muestras de intestino grueso y delgado (yeyuno e ileon) para análisis histológicos.



Figura 2. Extracción de sangre de la vena yugular del lechón.

Cepas

Las cepas utilizadas fueron aisladas a partir de intestinos de cerdos sanos recién sacrificados, provenientes de un rastro tipo inspección federal (TIF), a las cuales se les caracterizó previamente su resistencia al tránsito gastrointestinal y su actividad antagónica contra *S. choleraesuis* y *E. coli* K88.

Inoculación en Lechones.

La estimación de las células se hizo utilizando el tubo no. 0.5 del nefelómetro de McFarland. El sedimento celular se resuspendió en leche (NAN S-29®) reconstituida en agua estéril (Tortuero, 1995). Se hicieron las mezclas de las bacterias antes de ser administradas a los lechones las cuales se inocularon 5 ml de esta mezcla directamente al esófago, con agujas de alimentación (Figura 3) (Pollmann, 1980). El control solo recibió la leche reconstituida. La concentración de las bacterias fue dependiente de la edad (Tabla 8). El probiótico se administró los días 2, 5, 8 y 11 (Tortuero, 1995).

Desempeño en Lechones

Para determinar ganancia de peso los lechones fueron pesados individualmente los días 2, 11, y 21 del experimento.

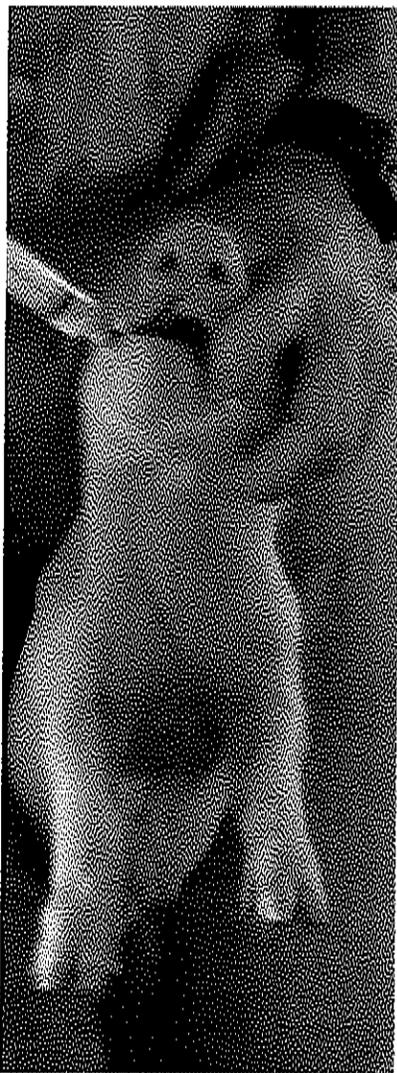


Figura 3. Alimentación de los lechones con agujas tiraleches.

Tabla 8. Dosis del probiótico administrado a los lechones.

Días de nacidos	Concentración de la bacteria* (células/ml)
2	7×10^5
5	7×10^5
8	3×10^7
11	3×10^7

*Tortuero, 1995

Determinación de IgA e IgG por Inmunodifusión Radial

Para la determinación de IgA e IgG se depositaron 5 μ L del suero en un pocillo, y se siguieron las recomendaciones de la casa comercial (Bethyl Laboratories, Inc.). Posteriormente se procedió a medir el diámetro del anillo de precipitado de esta reacción antígeno anticuerpo, con ayuda de un ocular. Los resultados de los estándares se aplicaron para determinar una curva de calibración mediante una gráfica semilogarítmica proporcionada por la casa comercial, siguiendo la técnica de Fahey & McKelvey, (1965). Los resultados de la muestra fueron extrapolados a esta curva para determinar la concentración de inmunoglobulinas expresadas en mg/dl.

Análisis Histológicos

Se analizaron en total 7 animales, tres alimentados con las bacterias en estudio y cuatro como control. Se sacrificaron 4 cerdos de 8 días de nacidos (2 cerdos suplementados con probióticos y 2 cerdos control), y 3 cerdos con 21 días de edad (1 cerdo suplementado con probióticos y 2 cerdos control), aparentemente sanos.

Se prepararon cortes histológicos del intestino de los lechones, de las porciones media, distal y proximal de yeyuno, íleon y colon y fueron enviados al Laboratorio de patología del DIF. Para la observación de los cortes, se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los parámetros a observar en los intestinos fueron los cambios en la luz intestinal, en la mucosa (epitelio y lámina propia), en la

submucosa (muscular y serosa). A cada cambio encontrado se calificó de la siguiente manera: sin cambios = 0, leve = +, moderado = ++ e intenso = +++.

Análisis Estadísticos

Se hizo un análisis de covarianza para determinar el efecto del peso al inicio del estudio, el número de partos, y concentraciones de IgA e IgG al inicio del estudio. El análisis estadístico se llevó a cabo por medio de un programa de computadora llamado NCSS (Hintze, 2000). Para determinar las diferencias en las medias se utilizó la prueba de Tuckey-Kramer. Se trabajó con un 95 % de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cepas Aisladas

Se aislaron en total 72 cepas (7 especies) de los distintos órganos muestreados, 40 cepas provenían de intestino delgado (56%) y 32 cepas del intestino grueso (44%). A estas cepas se les determinó la presencia de la enzima F6PPK y 54 cepas produjeron una reacción de color, mientras que las restantes viraron el color débilmente. Se tomó esta coloración como positiva porque el análisis fue objetivo, sin aparatos espectrofotométricos. Orban & Patterson, (2000) quienes modificaron la técnica de Scardovi para la detección de la enzima, encontraron que la especie *B. infantis* no mostraba cambios en la coloración en el tubo de reacción. Las especies obtenidas son presentadas en la Tabla 9, de las cuales sobresale el porcentaje de las especies de *B. choerinum*, *B. infantis* y *B. breve* (Figura 4). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Corona (2001) En el presente trabajo se encontró una distribución distinta de especies de bifidobacterias en el tracto gastrointestinal de los cerdos. Esta diferencia puede deberse a la edad, alimentación y medio ambiente, que cambian el balance ecológico de los intestinos (Gomez-Zavaglia y cols., 1998). No hubo diferencias significativas entre las especies ($p < 0.05$) respecto al órgano analizado.

Tabla 9. Porcentaje de aislamiento de las especies de *Bifidobacterium*.

Especie	Cepas aisladas	Porcentaje
<i>B. choerinum</i>	35	48.6
<i>B. infantis</i>	17	23.6
<i>B. breve</i>	8	11.1
<i>B. boum</i>	2	2.7
<i>B. thermophilum</i>	2	2.7
<i>B. indicum</i>	6	8.3
<i>B. sp.</i>	2	2.7

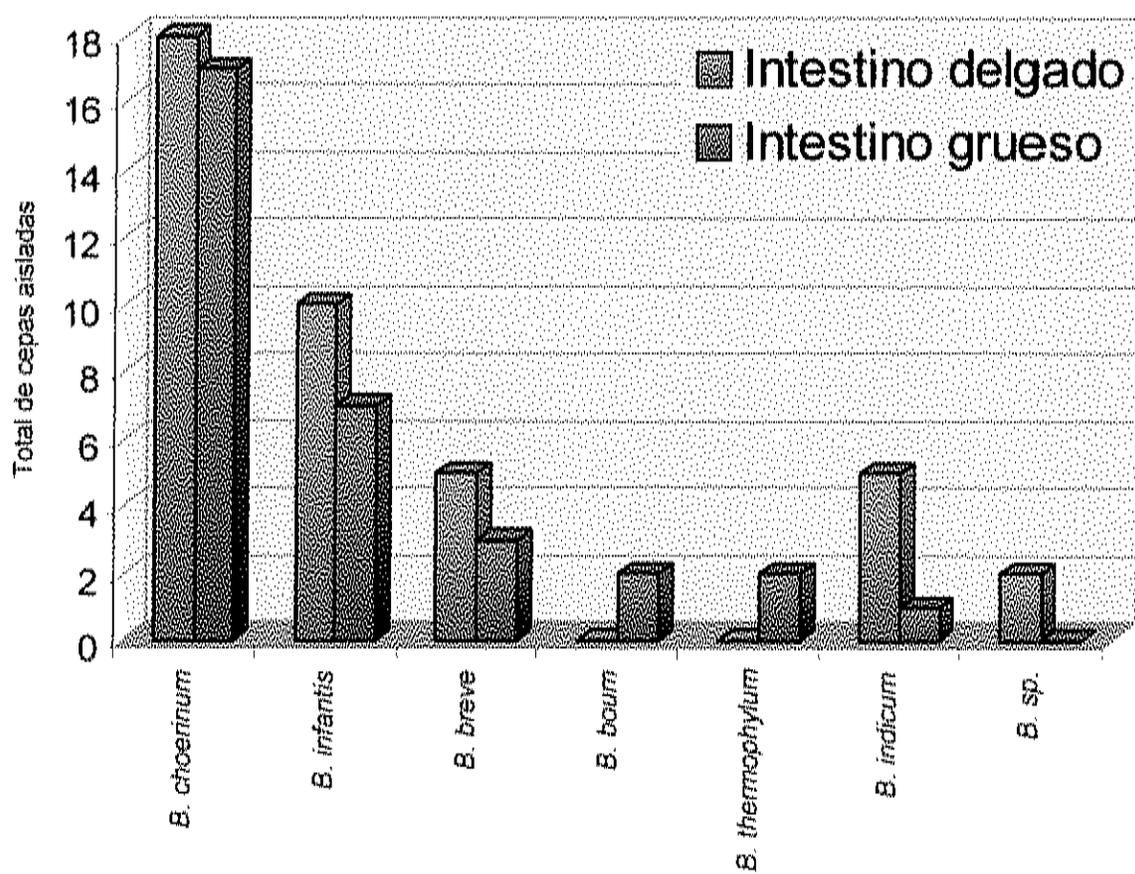


Figura 4. Especies de *Bifidobacterium* aisladas por órgano muestreado en cerdos sanos recién sacrificados.

Caracterización Probiótica

Existen varios criterios para la selección de un probiótico. Uno de los más importantes es sobrevivir a su paso por el tracto gastrointestinal, donde se verá expuesto a un pH bajo, provocado por el HCl generado en el estómago. Posteriormente será cubierto por sales biliares secretadas en el intestino delgado (Nousiainen & Setälä, 1993). En este trabajo se determinó la resistencia de las bifidobacterias al pH bajo y a las sales biliares. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las especies y su resistencia a sales biliares solamente. Se obtuvieron 37 cepas resistentes en un 40% a pH bajo y de estas solo 33 cepas resistieron las sales biliares (Figura 5).

Resistencia a pH 3.0

En total fueron 37 cepas resistentes al pH ácido. Estas cepas corresponden a cinco especies: *B. choerinum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. thermophilum* y *B. indicum*. Las especies restantes (*B. boum* y *Bifidobacterium* sp.) no mostraron ningún tipo de resistencia a estas condiciones (Figura 5). No hubo diferencias significativas en las cepas con respecto al porcentaje de resistencia a pH ácido.

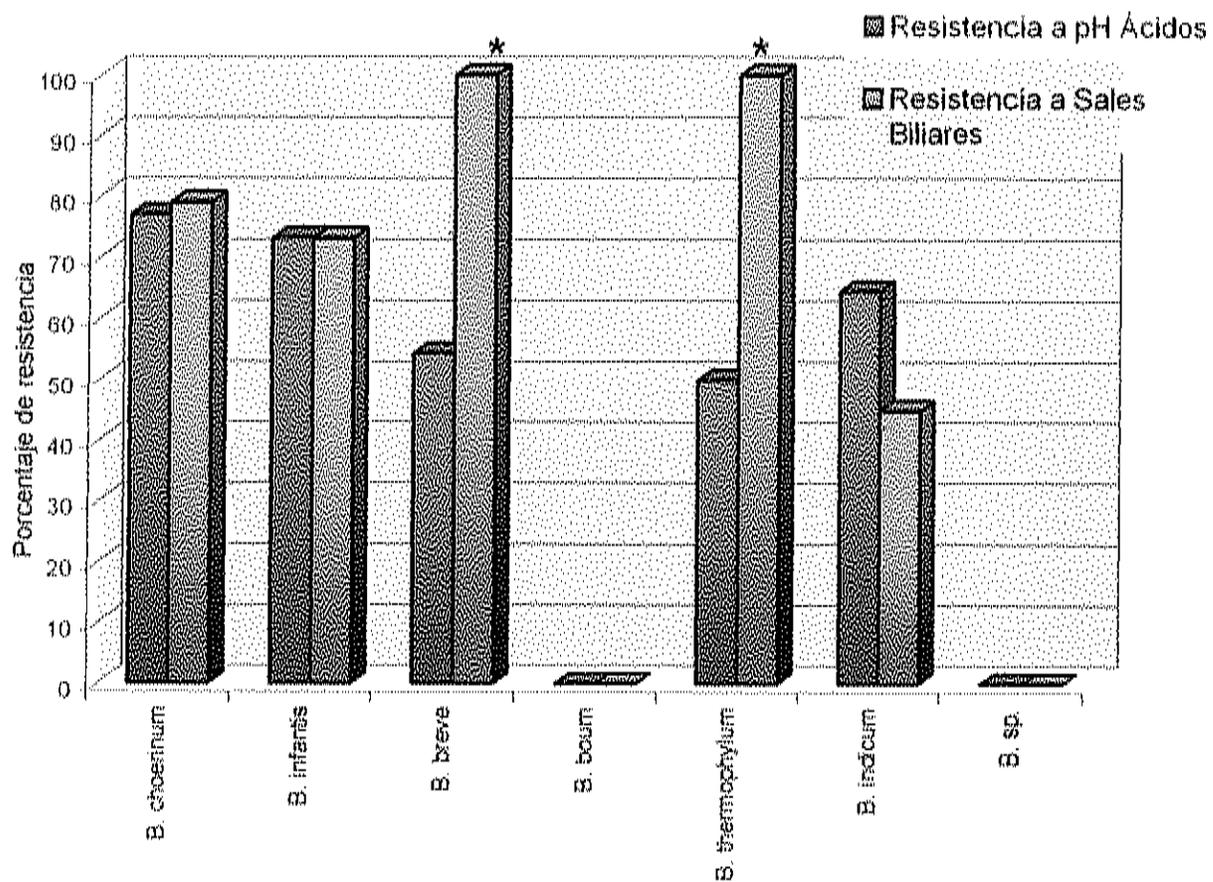


Figura 5. Porcentaje de resistencia al tránsito gastrointestinal de las especies de *Bifidobacterium* (* P=0.004)

Los porcentajes de resistencia coinciden con la investigación realizada por Corona, (2001), donde las especies que mas resistieron a las pruebas probióticas fueron las mismas que en el presente trabajo, a excepción de *B. indicum* la cual no generó resistencia a pH bajos ni sales biliares. La resistencia al ácido en algunos microorganismos es muy pobre. Sin embargo, microorganismos como bifidobacterias y lactobacilos han sido reportados como resistentes, pero con grandes diferencias de resistencia entre cepas (Charteris y cols., 1998). En investigaciones que se han realizado para aplicar esta bacteria como probiótica, se ha elegido por que son cepas mas resistentes a ácidos gástricos y sales biliares (Lee & Heo, 2000).

Resistencia a Sales Biliares

El siguiente punto a evaluar de las características probióticas de un microorganismo es su resistencia a las sales biliares en el intestino delgado. Los ácidos biliares al ser secretados al duodeno por la vesícula biliar en forma conjugada, se llegan a modificar a formas deconjugadas. Ambas son formas antibacterianas sensibles contra bacterias Gram positivas más que para Gram negativas (Dunne y cols., 1999).

De las 37 cepas que sobrevivieron al pH ácido, se les analizó su resistencia a las sales biliares, resultando 33 cepas de estas con un buen perfil probiótico. Las cepas pertenecían a las mismas especies resistentes al pH ácido (*B. choerinum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. thermophilum* y *B. indicum*). En

esta prueba si hubo diferencias significativas de las cepas con respecto a su resistencia a las sales biliares, siendo *B. breve* y *B. thermophilum* las especies que marcaron la diferencia por ser mas resistentes (Figura 5).

Los resultados de este trabajo no coinciden con otros autores quienes difícilmente encontraron una cepa resistente a pH bajos y a la concentración fisiológica de sales biliares de 0.5%. Gomez-Zavaglia y cols., (1998) obtuvieron tres cepas resistentes al tránsito gastrointestinal por encima del 23%. Estas cepas fueron *B. pseudolongum*, *B. infantis*, y *B. animalis*, y solo la primera mostró el mismo porcentaje de resistencia con el cual se hizo el criterio de selección del presente trabajo. Kociubinski y cols., (1999), encontraron la misma relación de cepas resistentes a las sales biliares, en conjunto con *B. breve*. Se observó en esta investigación que *B. pseudolongum* presentó un porcentaje de resistencia superior al resto de las bacterias. Sin embargo, se han documentado datos que apoyan los mismos generados en esta investigación, como el de Ibrahim & Bezkorovainy, (1993), quienes trabajaron con cuatro cepas de bifidobacterias (*B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* y *B. longum*) y todas resultaron muy resistentes a las condiciones adversas del tracto digestivo. Estos investigadores comprobaron que las bifidobacterias son capaces de recuperar sus características originales después de la exposición por 48 horas a las sales biliares, a excepción de *B. infantis*. Sin embargo, Gomez-Zavaglia y cols., (1998), demostraron que las cepas de *Bifidobacterium* no recuperan sus propiedades de membrana ante la exposición de estas a sales biliares, resultando difícil su adhesión al epitelio intestinal.

Se ha observado que el género *Lactobacillus* puede resistir mejor que las bifidobacterias a las condiciones del intestino delgado. Este fenómeno se puede entender porque los lactobacilos son habitantes normales del tracto intestinal superior e inferior, mientras que las bifidobacterias son bacterias colónicas (Kociubinski y cols., 1999).

Antagonismo Bacteriano

El intestino grueso es un complejo ecosistema el cual posee mas de 50 géneros de bacteria, y cientos de especies (Yusof y cols., 2000). Este ecosistema y el epitelio intestinal intacto, representan una barrera al movimiento de los patógenos, antígenos y otras sustancias nocivas del lumen intestinal a la sangre. En un desbalance de estos factores se comúnmente se produce un crecimiento excesivo de patógenos (Gomes & Malcata, 1999). Se ha sugerido que los probióticos se pueden coagregar al patógeno y liberar sustancias antagonicas (bacteriocinas y ácidos orgánicos) que actúan sobre estos microorganismos no deseados (Ouwehand y cols., 1999). Estudios en el género *Bifidobacterium* han mostrado que estas bacterias poseen propiedades promotoras de la salud y sus niveles pueden fluctuar y ser manipulados. El éxito de estos microorganismos sobre los patógenos ha sido por la producción de ácido acético y ácido láctico, así como por sustancias similares a los antibióticos y bacteriocinas que tienen actividad antagonica contra patógenos.

Se analizó la capacidad antimicrobiana a las 33 cepas de bifidobacterias que sobrevivieron a las condiciones artificiales del tracto digestivo. Se hicieron ensayos preliminares de las bifidobacterias seleccionadas y todas mostraron actividad antagónica contra *E. coli* y *S. choleraesuis*. Según los datos estadísticos no hay diferencias significativas con respecto al antagonismo de las bifidobacterias contra los patógenos. Sin embargo, la significancia se marcó cuando se compararon los diámetros de inhibición generados contra *E. coli* cotejados con *S. choleraesuis*, siendo mas fuerte su actividad antimicrobiana contra *E. coli*. Las cepas que sobresalieron en los halos de inhibición (7 cepas) fueron 5 especies de *B. infantis*, una de *B. choerinum* y otra de *B. indicum*. Yusof y cols., (2000), trabajaron con cepas de bifidobacteria aisladas de heces de infantes y encontraron que las cepas de *B. infantis* fueron mas inhibitorias contra *E. coli* comparada con *S. typhimurium*. Lo mismo publicaron Gibson & Wang, (1994) quienes encontraron una inclinación de esta bacteria (*B. infantis*) hacia *E. coli* mas que para *Salmonella*, con similares halos de inhibición a los determinados por Yusof y cols., (2000). Se observó una marcada diferencia en la actividad antagónica contra *Salmonella*, siendo mayor en la especie de *B. infantis* por presentar halos de inhibición mayores (Tabla 10). Gibson y Wang, (1994), concluyeron que las cepas pertenecientes al género de *B. infantis* y *B. longum* fueron mas antagónicas en sus estudios.

Tabla 10. Efecto antagonico promedio por especies de bifidobacterias contra los patógenos *E. coli* y *Salmonella choleraesuis*.

	<i>B. choerinum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>B. indicum</i>
<i>E. coli</i> ^a	20.0	19.7	25
<i>S. choleraesuis</i> ^b	9.6	10.2	11

Las mediciones de los halos están hechas por mm.

Literales distintas en la misma hilera son estadísticamente diferente ($P=0.001$).

Las cepas que quedaron seleccionadas se les expuso entre sí para ver el antagonismo que tenían unas contra otras y seleccionar las que fueran aptas para ser inoculadas en un mezcla (Tabla 11). Los resultados mostraron que dos de estas cepas inhibieron el crecimiento de otras cepas de bifidobacterias. Una de ellas fue *B. indicum*, esta bacteria presentó una mayor reacción antagónica contra los mismos de su genero. La otra bacteria fue de la especie *B. infantis* pero los halos de inhibición generados (y no en todas las cepas) fue muy pequeño.

Antibiograma

Los probióticos son muy frecuentemente mencionados como sustitutos de los antibióticos, pero también es muy común que se administren combinados con los antimicrobianos, para obtener una acción sinérgica (Nousiainen & Setälä, 1993; Abe y cols., 1995). El objetivo de esta determinación es el de mantener viable a la bifidobacteria en el tracto digestivo, sin ninguna agresión durante algún tratamiento con antibióticos. Se han hecho pocos estudios con respecto a la sensibilidad de estas bacterias a los antimicrobianos (Ballongue, 1998). Se realizó un antibiograma a las siete cepas que presentaron mayor actividad antagónica contra los patógenos (Tabla 12). Todas las cepas fueron susceptibles a cloranfenicol, penicilina, amoxicilina y nitrofurantoina, concordando con los datos mostrados en otros trabajos (Ballongue, 1998; Miller-Catchpole, 1989b; Scardovi, 1986; Velázquez & Feirtag, 1997).

Tabla 11. Antagonismo bacteriano entre las cepas de bifidobacterias aisladas del tracto gastrointestinal del cerdo..

Cepas	<i>B. infantis</i> (1)	<i>B. infantis</i> (2)	<i>B. infantis</i> (3)	<i>B. choerinum</i> (4)	<i>B. indicum</i> (5)	<i>B. infantis</i> (6)	<i>B. infantis</i> (7)
<i>B. infantis</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. infantis</i> (2)	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. infantis</i> (3)	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. choerinum</i> (4)	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. indicum</i> (5)	10	10	4	6	0	4	4
<i>B. infantis</i> (6)	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. infantis</i> (7)	4	5	0	5	0	4	0

Las mediciones de los halos están dadas en mm.

El número posterior en cada especie representa la cepa analizada.

La nitrofurantoina mostró características de antibiótico dependiente de concentración en una cepa de *B. infantis*. Con respecto a la tetraciclina, 6 cepas solamente no presentaron sensibilidad, mientras que la otra fue muy susceptible. Esta variabilidad ya ha sido documentada por otros investigadores, quienes indicaron que la susceptibilidad de estas bacterias a la tetraciclina varía entre 10 y 500 $\mu\text{g/mL}$ de antibiótico. También se ha demostrado la variabilidad de la susceptibilidad de las bifidobacterias inter- e intra- especies (Ballongue, 1998; Miller-Catchpole, 1989b; Scardovi, 1986; Velázquez & Feirtag, 1997). Se cree que se deba a que la mayoría de las especies analizadas fueron *B. infantis*, y fueron cepas de esta especie quienes mostraron halos de inhibición muy fuertes (24 mm), así como un pequeño halo (4 mm) que no indica susceptibilidad intermedia, y sin halo que nos dice que no son sensibles a este antibiótico.

Tabla 12. Susceptibilidad de las cepas a distintos antibióticos.

Cepa	Antibióticos*					
	1	2	3	4	5	6
<i>B. infantis</i> (1)	27	25	24	32	23	34
<i>B. infantis</i> (2)	25	0	4	24	27	21
<i>B. infantis</i> (3)	28	0	0	32	27	32
<i>B. choerinum</i> (4)	40	30	0	26	25	21
<i>B. infantis</i> (6)	30	29	0	30	24	32

*Las mediciones de los halos están hechas en mm.

- 1 = Cloranfenicol
- 2 = Eritromicina
- 3 = Tetraciclina
- 4 = Amoxicilina
- 5 = Nitrofurantoina
- 6 = Penicilina

Al exponer a estas bacterias a la eritromicina, la susceptibilidad fue variable de igual manera que con tetraciclina, solo que con este antibiótico fueron dos cepas las que no fueron sensibles. Estos resultados son contradictorios a los publicados anteriormente, debido a que se ha probado que este género es susceptible a este antibiótico (Ballongue, 1998; Miller-Catchpole, 1989b; Scardovi, 1986; Velázquez & Feirtag, 1997).

Estudio *in vivo*

La Tabla 13 muestra el desempeño de los lechones en el presente estudio. Se puede observar que no hubo diferencias significativas en el número de partos de las cerdas seleccionadas por lo que este no fue un parámetro a afectar en el desempeño de los lechones. La mortalidad en las camadas al destete (día 21) no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el grupo control (8 muertos) y el suplementado con bifidobacterias (9 muertos). Se observó que la mayor causa de mortalidad fue aplastamiento por las madres. El peso de los lechones al inicio del experimento (día 2 de nacido), a los días 11 y 21 así como la ganancia de peso (2-21 días) no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) entre los tratamientos. Contrario a lo reportado por Abe y cols., quienes observaron diferencias significativas, siendo el grupo alimentado con el probiótico el de mayor peso (en este caso una cepa de *B. pseudolongum*). Estos autores utilizaron antibióticos además del probiótico. Es importante señalar que los animales suplementados con el probiótico pero sin

adicionar antibióticos la ganancia de peso no fue significativamente diferente del control sin embargo, el valor fue marcadamente mas bajo en el grupo control.

Si se comparan estos pesos con los reportados por Abe y cols., (1995), se puede apreciar que por igual en esa investigación se inició el ensayo con una diferencia de pesos (1.46 kg para tratamiento y 1.60 kg para el control), siendo los del grupo suplementados con bifidobacteria los que tendieron a tener menor peso, sin ser estadísticamente diferentes ($P > 0.05$).

Sin significancias estadísticas ni covariables que interfieran en el resultado. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Gudding en 1984 (en Rangel, 1994), quien trabajó con dos grupos de cerdos, a uno le administró una mezcla de *Streptococcus faecium* y un control. Rosales y cols, en 1983 (en Rangel, 1994) y Rangel, (1994) por otra parte, no encontraron diferencias significativas entre grupos tratados con bacterias benéficas y aquellos señalados como testigos.

No hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) en los días de muestreo tomando como covariables el peso al inicio del ensayo (día 2), número de partos de la madre, el total de IgA y de IgG en el día 2. Pero lo que se puede destacar es el efecto del peso al inicio del experimento (día 2), el cual tuvo efectos significativos ($P = 0.001636$) en el peso del día 11, datos que no fueron significativos entre control y problema del mismo día.

Tabla 13. Desempeño los lechones suplementados con bifidobacteria y control

Tratamientos	n	Paridad	Total Nacidos	Lechones vivos D-21	Peso D-0	Peso D-11	Peso D-21	Ganacia Peso ¹
Control	8	2.3 (0.49)	10.3 (0.94)	9.1 (1.24)	1.84 (0.08)	3.37 (0.17)	5.51 (0.25)	3.66 (0.22)
Bifidobacterias	9	2.6 (0.47)	9.4 (0.89)	8.4 (1.17)	1.67(0.08)	3.10 (0.16)	4.98 (0.24)	3.33 (.21)
Significancia		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

n= No. de camadas , NS= No significativo (p>0.05) ¹ Ganancia de peso de los lechones fue calculada restando los pesos del día 21 respecto del día 0

Valores entre paréntesis representan el error standard

En el peso del día 21, no hubo parámetros que influenciara en los resultados y tampoco diferencias significativas entre los mismos. El grupo control fue el que obtuvo mayor peso al final del ensayo, pero sin significancia ($P>0.05$).

En otras investigaciones se obtuvieron resultados similares, utilizando un producto comercial (Fastrack™), el cual contenía *S. cerevisiae*, en una concentración de 4×10^9 células por libra de producto (Windschitl y cols., 1991). Zani y cols., en 1998 investigaron la ganancia de peso en animales destetados hasta los 21 días y tampoco encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) con el probiótico comercial utilizado, que contenía *B. cereus*. Observaron que a una concentración de la bacteria de 5×10^8 o de 1×10^9 esporas viables por kg^{-1} de alimento, se podía mejorar la ganancia de peso. Al reducir la concentración de este bacilo a 1×10^8 o $2.5 \times 10^8 \text{ kg}^{-1}$ de alimento, la ganancia de peso se vio reducida. Oropeza y cols., (1998), tampoco encontraron diferencias significativas en la ganancia de peso en becerros, usando un probiótico comercial a base de *Lactobacillus*, en distintas concentraciones. Estos investigadores encontraron que la cantidad de bacterias consumidas tenía influencia en la ganancia de peso. Así mismo, se menciona que Morrill y cols. (1977, en Abe y cols., 1995) no usó el suficiente número de bacterias en su estudio y uso cepas no aisladas de animales. Probablemente la concentración de bacterias en la presente investigación no era la adecuada, ya que Fuller (1989) y Lyons, (1987) resaltan como un punto relevante, la

concentración de bacterias como clave para el éxito en el ensayo con probióticos. También se ha propuesto que los probióticos son efectivos cuando el animal se encuentra en estado de estrés (Oropeza y cols., 1998; Doyle, 2001), pero si se proporcionan dosis de bacterias probióticas incorrectas, pueden provocar daños tisulares a nivel intestinal con alteraciones en las estructuras de las vellosidades, así como un alto concentrado linfocitario en las placas de Peyer. Esto hace inapropiado el uso de probiótico como preventivo en las infecciones contra *S. typhimurium*, debido a la reacción inflamatoria que pueden producir (Perdigón & Pesce, 2000).

Inmunoglobulinas

IgA. La Tabla 14 muestra las concentraciones de las inmunoglobulinas de tipo A en el suero de los lechones en los diferentes días de muestreo. No hubo diferencias significativas en las concentraciones de IgA entre tratamientos en los diferentes días de muestreo aunque en los días 11 y 21 las concentraciones de IgA fueron ligeramente mayores en el grupo suplementado con bifidobacterias sin ser estadísticamente significativas ($p > 0.05$) respecto al grupo control. También se encontró que las concentraciones fueron similares a las del cerdo adulto como la reportan Tizard (2000) y Sanchez.Vizcalno (2000). Por otro lado, se observó una disminución significativa ($p < 0.001$) de las concentraciones de IgA conforme avanzaba el experimento en ambos tratamientos. Estas altas concentraciones al inicio del experimento (dos días de

nacido) se deben a la ingesta del calostro a través de cual la madre le provee al recién nacido las inmunoglobulinas necesarias para su protección mientras se inicia la maduración del sistema inmune del lechón. (Tizard, 1996; Morilla, 1989; Barceló & Cugat, 2002). Las inmunoglobulinas pasan libremente a través de las células intestinales los primeros días de vida del lechón, debido a que este órgano no tienen la capacidad aún de seleccionar las moléculas que pueden entrar al sistema circulatorio (Gomez y cols., 1998). Solo las IgA son retenidas en gran medida en el tracto digestivo, para protección de los animales contra enteropatógenos (Morilla, 1998). La concentraciones de inmunoglobulinas en calostro es mayor que en leche (ver Tabla 5), este es proceso natural, ya que conforme madura el sistema inmune del lechón, éste requiere menor cantidad de inmunoglobulinas de la madre.

IgG. En la Tabla 15 se muestra las concentraciones de IgG de suero de lechones en los diferentes días de muestreo. Se observó que siguió el mismo patrón que las IgA es decir no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y disminuyeron significativamente ($p < 0.001$) a través del estudio. De acuerdo a Teubner (2002), las mayores concentraciones de IgG, se encuentran al segundo día de vida del lechón, con niveles de inmunoglobulinas similares a la de un adulto. Durante la segunda y tercer semanas disminuye sus valores drásticamente y después sube sus niveles a la concentración que permanecerá hasta su vida adulta, produciendo sus propios anticuerpos.

Tabla 14. Concentraciones de IgA (mg/dl) en lechones durante el estudio con probióticos y control.

Días de muestreo	Probióticos	Control
2	556.9 ^a (14.1)	662.7 ^a (14.4)
11	71.3 ^b (4.4)	65.3 ^b (15.5)
21	42.8 ^c (3.9)	41.8 ^c (14.9)
Significancia	***	***

Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas
 *** P<0.001

Tabla 15. Concentración de IgG (mg/dl) en lechones durante el estudio con probiótico y control.

Días de muestreo	Probióticos	Control
2	2530.7 ^a (80.1)	2878.1 ^a (83.8)
11	1300.5 ^b (79.0)	1395.5 ^b (83.8)
21	782.6 ^c (76.9)	821.8 ^c (81.3)
Significancia	***	***

Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas

*** $P < 0.001$

En el presente trabajo se observaron concentraciones mayores de IgG que de IgA en ambos grupos, durante todo el ensayo (Figura 6). Esto esta n concordancia con lo reportado en la literatura. Esto se debe a que en el calostro se encuentran en mayor cantidad las IgG (Blecha, 2001). Conforme pasan los días ambas inmunoglobulinas tienden a disminuir su concentración en el suero, debido también a su tiempo de vida media.

Se encontró que las concentraciones de IgG e IgA al inicio del experimento no tuvieron influencia en las concentraciones de ambas inmunoglobulinas al término del experimento. Contrario a los resultados obtenidos en este estudio hay reportes que encontraron que al administrar *L. casei* a ratas, hubo un incremento en la producción de IgA en el lumen intestinal, lo cual provee una defensa contra patógenos como *S. typhimurium* (Perdigón y cols., 1990 en Nousiainen & Setälä, 1995). En estudios anteriores hechos en ratones (Shiba y cols., 2003), encontraron niveles mas altos de IgG en ratones infectados con *Bacteroides vulgatus* en comparación con los ratones inoculados con *Bacteroides vulgatus* pero tratados con *B. infantis*.

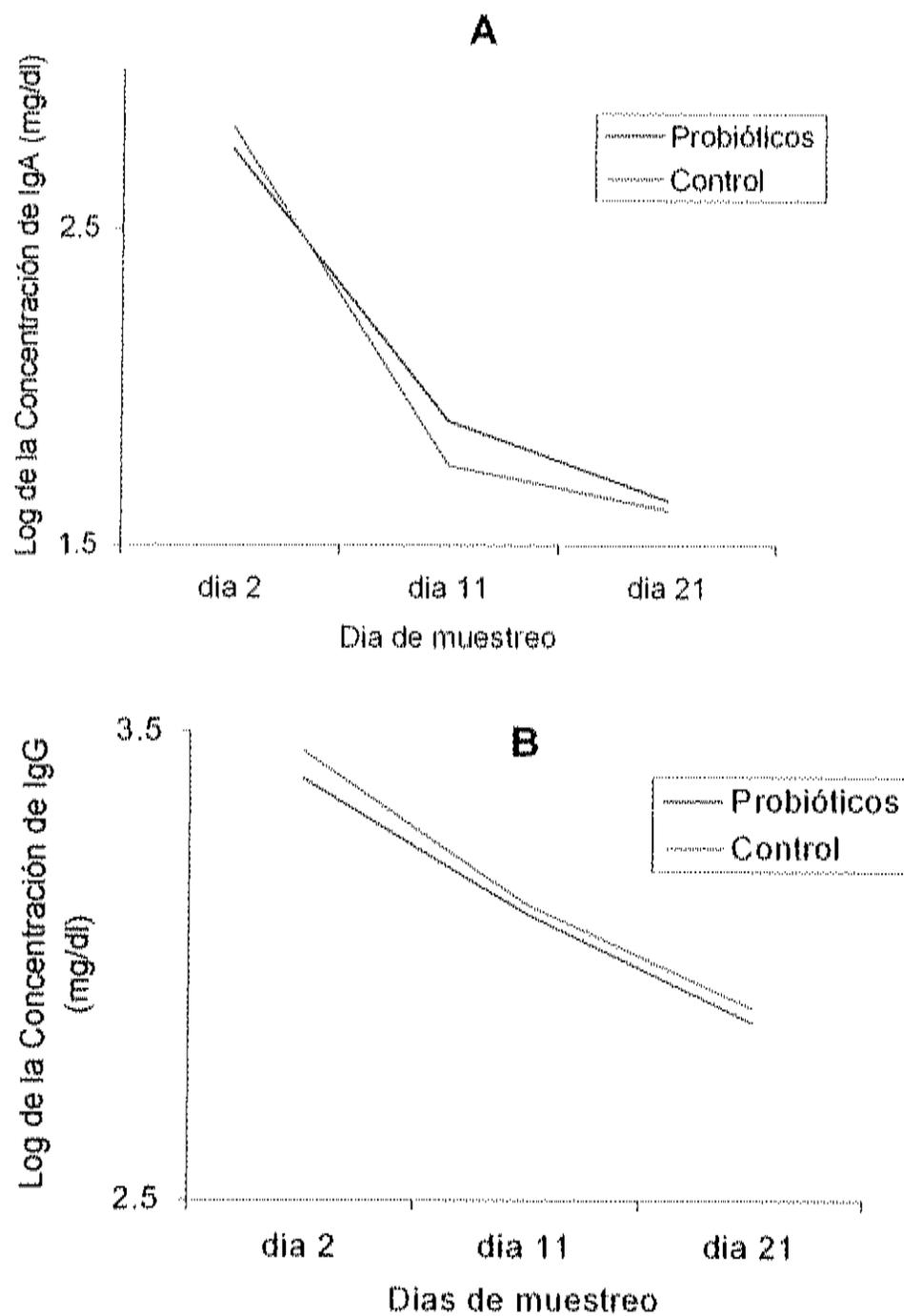


Figura 6. Concentración de IgA e IgG en suero de lechones en los diferentes días de muestreo.

Análisis Histológico

Las Tablas 15 y 16 muestran las observaciones histopatológicas en intestinos de lechones sacrificados de ambos tratamientos en los días 8 y 21 del experimento. Los daños mas severos se presentaron a los 21 días del experimento en el grupo control respecto al grupo suplementado con bifidobacterias siendo ileum y colon los más afectados. También se observó que las capas submucosa, muscular y serosa no mostraron alteraciones o cambios sin embargo en la mucosa sí se observaron cambios morfológicos en ambos días de muestreo, como puede observarse en las tablas mencionadas y la Figura 7 (B – F).

Se observó desprendimiento masivo de las células epiteliales encontradas en la luz intestinal (CCEDLI) y la presencia de necrosis de la punta de las vellosidades (NAVI) (Figura 7B y 7F) en los lechones de ambos grupos, este fenómeno se puede determinar como efecto-causa, siendo secuenciales y puede ser debida a la presencia de algún tóxico o algún microorganismo enteropatógeno como *E. coli*, ya que de acuerdo a la bibliografía en estos casos se produce el fenómeno (Kumar y cols. 2001). Se detectaron marcadas diferencias microscópicas entre los tejidos en los días de sacrificio (8 y 21 días), pero no entre el grupo control y el suplementado que consistieron en un aumento en el infiltrado linfocitario en la lámina propia (IILLP) (Figura 7E).

Tabla 15. Análisis histopatológicos en intestinos de lechones sacrificados a los 8 días de nacimiento.

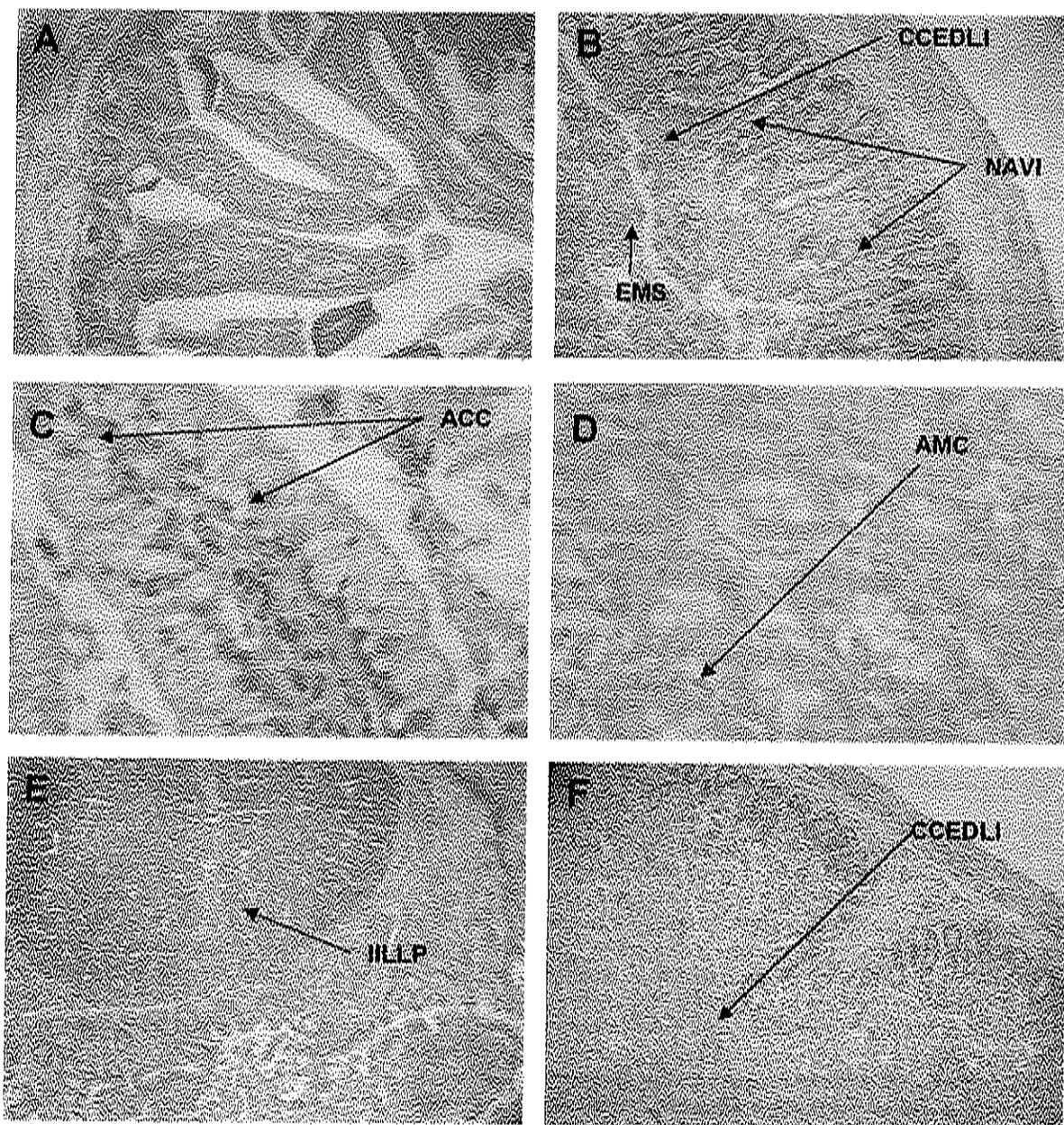
ID del cerdo	Yeyuno	Ileum	Colon
Cerdos con tratamiento			
P	IILLP; AMC	ELP	No hubo muestra
M	sin cambios	HPP; EMS	No hubo muestra
D	sin cambios	HPP; EMS	No hubo muestra
Cerdos con tratamiento			
P	ELP; HPP	ECA; EMS borde en cepillo aparente	EMS; AMC
M	sin cambios	EMS	EMS; AMC
D	borde en cepillo aparente	EMS; HPP	No hubo muestra
Cerdos control			
P	VA	VA; ECA	EMS; AMC
M	IILLP; moco ++	VA; ECA; HPP	EMS, AMC
D	VA; ECA	EMS; HPP	EMS
Cerdos control			
P	sin cambios	EMS	EMS
M	sin cambios	EMS	EMS
D	EMS	EMS; HPP	EMS

P = proximal, M = medial, D = distal; intensidad o severidad = +, ++, +++
 CCEDLI = cúmulo de células epiteliales desprendidas en la luz intestinal.
 NAVI = necrosis del apex de la vellosidad intestinal.
 HPP = hiperplasia de la placa de Peyer.
 VA = vellosidades altas.
 ECA = epitelio columnar alto.
 IILLP = infiltrado linfocitario en la lámina propia.
 EMS = epitelio mucosecretor.
 AMC = abundantes mitosis en criptas
 ELP = edema en lámina propia

Tabla 16. Análisis histopatológicos en intestinos de lechones sacrificados a los 21 días de nacimiento.

ID del cerdo	Yeyuno	Ileum	Colon
Cerdo con tratamiento.			
P	CCEDLI +++; NAVI +++; HPP	CCEDLI ++; NAVI; IILLP +; HPP	VA; IILLP +; EMS
M	CCEDLI +; VA; ECA; IILLP +	CCEDLI ++; NAVI; IILLP +	VA; IILLP +; EMS HPP
D	VA; ECA; EMS	CCEDLI +++; NAVI; IILLP +; HPP	CCEDLI +++; NAVI; IILLP +
Cerdo control.			
P	CCEDLI +; NAVI +	CCEDLI +++; NAVI +++; IILLP +; AMC; moco ++	CCEDLI +++; NAVI +++; IILLP +; AMC; moco ++
M	CCEDLI +++; NAVI +++; IILLP +; HPP	CCEDLI +++; NAVI +++; IILLP +; AMC; moco +++	CCEDLI +++; NAVI +++; IILLP +; AMC; moco ++
D	CCEDLI +++; NAVI +++; IILLP +; AMC; moco ++	CCEDLI +++; NAVI +++; IILLP +; AMC; moco +++	CCEDLI +++; NAVI +++; IILLP +; AMC; moco ++
Cerdo control.			
P	CCEDLI +; NAVI + IILLP +; AMC; moco ++	CCEDLI +; NAVI + IILLP +; AMC; moco ++	CCEDLI +; NAVI + IILLP +; AMC; moco ++
M	NAVI + IILLP +; AMC; moco ++	CCEDLI +; NAVI + IILLP +; AMC; moco ++	CCEDLI +; NAVI + IILLP +; AMC; moco ++
D	NAVI + IILLP +; AMC; moco ++	CCEDLI +; NAVI + IILLP +; AMC; moco ++	CCEDLI +; NAVI + IILLP +; AMC; moco ++

P = proximal, M = medial, D = distal, intensidad o severidad = +, ++, +++
 CCEDLI = cúmulo de células epiteliales desprendidas en la luz intestinal.
 NAVI = necrosis del apex de la vellosidad intestinal.
 HPP = hiperplasia de la placa de Peyer.
 VA = vellosidades altas.
 ECA = epitelio columnar alto.
 IILLP = infiltrado linfocitario en la lámina propia.
 EMS = epitelio mucosecretor.
 AMC = abundantes mitosis en criptas
 ELP = edema en lámina propia



CCEDLI= cúmulo de células epiteliales desprendidas en la luz intestinal; NAVI= Necrosis del ápex de la vellosidad intestinal; EMS= Epitelio Mucosecretor; ACC =abundantes células calciformes; AMC= Abundante mitosis en criptas; IILLP = infiltrado linfocitario en la lámina propia.

Figura 7. Observaciones más sobresalientes del análisis de los cortes histológicos de intestinos de cerdos en los días 8 y 21. Corte histológico de intestino normal (A); cortes histológicos de intestinos dañados (B,C,D,E y F).

Se observó la necrosis de los punta de las vellosidades (Figura 7 B) y la presencia del cúmulo celular intraluminal (CCEDLI) en los cerdos de 21 días de edad en ambos tratamientos (Figura 7B y 7F), con respecto a los cerdos de 8 días de edad. El infiltrado linfocitario en la lámina propia se vio acompañado de hiperplasia de la placa de Peyer, hallazgo en ambos días de sacrificio, en ambos grupos. Estos dos cambios inflamatorios corresponden a procesos infecciosos crónicos. Esta respuesta quizá mayor a 10 días, debido a que los nódulos linfáticos de la placa de Peyer se observaron hiperplásicos y con mucha reactividad. El posible agente agresor podría aún estar presente, ya que hubo infiltrado linfocitario en la lámina propia. Se han observado los mismos resultados causados por patógenos invasivos como son *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella*. En estos estudios se ha encontrado que los daños sufridos afectan seriamente los procesos normales de absorción y excreción de agua y electrolitos (Canal y cols. 1999).

El hecho de haber sido encontrados los daños mas severos en los cerdos control, sugieren que las bacterias ácido lácticas pueden inducir beneficios en la salud. Mengheri y cols., (1999), encontraron que cepas de *B. animalis* administradas en ratas con deficiencia de zinc, pueden reducir la severidad de daño en el intestino delgado. Ellos propusieron que el efecto benéfico de las bifidobacterias resulta de su habilidad para ejercer una actividad antiinflamatoria, modulando la expresión de las citoquinas. Por otro lado, Shiba y cols., (2003), observaron que cepas de *B. infantis* y *B. adolescentis* pueden

inhibir el enlace de los patógenos del género *Bacteroides*, los cuales producen severa respuesta inflamatoria en ratas. Esta acción protectora es proporcionada por un factor proteico, producido por las bifidobacterias. Como el enlace de los patógenos a los enterocitos es clave para invadir y desencadenar una respuesta inmunológica sistémica, al producirse una exclusión competitiva de las cepas probióticas por los sitios de enlace, no se lleva a cabo la invasión. Sin embargo, no está claro aún el porqué las cepas de bifidobacterias pueden mejorar la histología del intestino.

En el presente estudio, también se observó que el lechón suplementado con bifidobacteria, sacrificado el día 21 tenía las vellosidades más altas que los dos cerdos controles.

Como práctica común en las granjas porcinas se entrena a los cerdos en el consumo de alimento sólido, en bajas cantidades, a partir de los 14 días de edad, para que el cambio al destete no sea tan brusco. Estas actividades podrían llegar a afectar moderadamente la morfología de las vellosidades.

Un cerdo del grupo control fue seleccionado para comparar con las muestras restantes, por considerarse morfológicamente normal todos los segmentos del intestino (Figura 7A). Este criterio, ya ha sido referido en otras investigaciones donde se observó que en cerdos lactantes inoculados con bacterias, no se observaban anomalías en algunos casos. La posible ausencia de signos de inflamación puede ser atribuida en parte al efecto protector del calostro (Fedorka-Cray y cols., 1999).

En lo individual, cada cerdo mostró similitudes en los cambios suscitados de un segmento a otro, pero mostrando una ligera variación en el colon respecto al intestino delgado. Canal y cols. (1999), observaron que el ileum es la sección mas afectada por cepas patógenas de *E. coli*.

Además, se tienen las figuras mitóticas como aspecto sobresaliente (Figura 7D), así como la reacción inflamatoria mas aparente en los casos de cerdos destetados (21 días de edad) suplementados con bifidobacteria. Estos aspectos suelen ser cambios transitorios en la fisiología del animal debido al crecimiento. El edema en la lámina propia y la presencia del epitelio mucosecretor (Figura 7C) (reacción inflamatoria) son de aparición primaria frente a un aspecto nocivo (biológico, físico, traumático ó tóxico). Estos fenómenos son respuesta inicial al proceso inflamatorio en el tejido agredido para eliminar mas rápidamente al agente agresor. La multiplicación o reproducción celular (mitosis) es distinto en cada tejido. Tanto el epitelio intestinal como la piel, responden a cualquier agresión con mayor índice de multiplicación celular. En este estudio, la presencia de abundante mitosis en las criptas puede deberse tanto a la posible reparación de un daño (Adami & Pignataro, 2000), ó bien a la multiplicación celular normal para la edad del animal (Dr. López Cervantes). Esto se observó en los diferentes días de sacrificio, que pueden ser causa del proceso mismo de crecimiento del cerdo más que por una infección.

CONCLUSIONES

Se aislaron siete especies del tracto gastrointestinal de cerdos sanos: *B. choerinum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. indicum*, *B. thermophilum*, *B. boum* y *Bifidobacterium* sp. De las siete especies, *B. choerinum*, *B. infantis*, y *B. breve* fueron las más frecuentemente aisladas.

De 72 cepas de bifidobacterias aisladas, 33 mostraron resistencia al tránsito gastrointestinal, correspondientes a 5 especies: *B. choerinum*, *B. infantis*, *B. indicum*, *B. breve* y *B. thermophilum*.

Todas las cepas resistentes al tránsito gastrointestinal mostraron antagonismo microbiano contra patógenos, pero 7 cepas tuvieron el mayor efecto antagónico, sin diferencias entre todas las cepas, contra cada uno de los patógenos por separado. El efecto antagónico por las bifidobacterias es más marcado contra *E. coli* comparado con *S. choleraesuis*, existiendo diferencias significativas.

El antibiograma reveló que la susceptibilidad de las 7 cepas analizadas a tetraciclina y eritromicina es en forma variable. La susceptibilidad hacia tetraciclina y eritromicina es inter- e intra- especies. De las cepas analizadas, todas son susceptibles a cloranfenicol, penicilina, amoxicilina y nitrofurantoina, con halos de inhibición regularmente homogéneos.

El estudio *in vivo* mostró que no hubo efecto significativo de la suplementación con bifidobacteria en el desempeño de los lechones ya que no hubo diferencias de peso en los diferentes días de muestreo así como en

ganancia de peso (día 2 al día 21), y en mortalidad al destete respecto al grupo control.

Las concentraciones séricas de inmunoglobulinas A e inmunoglobulinas G de los lechones no fueron diferentes estadísticamente de las del grupo control en los diferentes días de muestra. Ambas inmunoglobulinas disminuyeron en el transcurso del experimento.

Los estudios histológicos en el intestino delgado, sugieren que la mezcla de bifidobacterias produjeron un aumento en las vellosidades y un incremento del infiltrado linfocitario así como también el estado tisular del intestino a nivel microscópico al destete (día 21), pero sin ser concluyente debido a que el número de cerdos sacrificados fue muy bajo. De ahí, que se requiere de un mayor número de cerdos para asegurar este efecto benéfico de la mezcla de bifidobacterias a nivel intestinal.

RECOMENDACIONES

Se recomienda hacer nuevos ensayos en cerdos donde se aplique distintas dosis de probióticos a los cerdos para encontrar la concentración idónea. Además de utilizar un mayor número de animales para determinar el efecto de los probióticos en la ganancia de peso así como en nivel de daño en intestino delgado.

Otro punto es hacer un análisis antagónico *in vivo* de cepas de *E. coli* K88 y de *S. choleraesuis* que son las que más afectan a los cerdos.

Así mismo, se sugieren ensayos de adherencia celular de las bifidobacterias para determinar su adherencia en el tracto gastrointestinal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abe, F., N. Ishibashi & S. Shimamura. 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J. dairy Sci.* 78:2838-2846.
2. Adami, J. & S. Pignataro. 2000. Lesiones agudas de la mucosa gastroduodenal. IIIº Simposium Internacional de Patología Gastroduodenal. Neuquén. Abril.
3. Anderson, D.B., V.J. McCracken, R.L. Aminov, J.M. Simpson, R.I. Mackie, M.W.A. Verstegen & H.R. Gaskins. 1999. Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. *Pig News and Information.* 20(4): 115N-123N.
4. Ballongue, J. 1998. Bifidobacteria and probiotic action. En: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects.* Segunda edición. Salminen S. & von Wright Atte. Marcel Dekker, Inc. New York. Pág. 519-587.
5. Barceló, J. & S. Cugat. 2002. Control sanitario en diferentes sistemas de producción (II parte). *Síntesis Porcina.* Julio-agosto. Pág. 14-23.
6. Berreira, M. 1996. Panorama internacional de la producción de carne de cerdo. *Claridades Agropecuarias.* Junio. 34:21-24.
7. Biavatti, B. & P. Mattarelli. 1991. *B. ruminantium* sp. nov. and *B. merycicum* sp. nov. from cattle. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 41:163-168.
8. Blecha, F. 2001. *Biology of the Domestic Pig.* W. G.Pond & H. J. Mersmann editors. Cornell University Press, USA. Pág. 688-711.
9. Borriello, S.P., W.P. Hammes, W. Holzapel, P. Marteau, J. Schrezenmeir, M. Vaara & V. Valtonen. 2003. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clinical Infectious Diseases.* 36: 775-780.
10. Campos, L. 1993. Sonora y Baja California podrán exportar porcinos. *Síntesis Porcina.* 12(2):37-38.
11. Canal, A.M, V. Cubillos, J. Zamora, G. Reinhardt, E. Paredes, R. Ildelfonso & A. Alberti. 1999. Lesiones macro y microscópicas de intestino delgado de cerdos neonatos sin calostrear inoculados experimentalmente con cepas de *E. coli* fimbriadas. *Arch. Med. Vet.* 31(1).

12. Candia, M.C. 1996. Evaluación del impacto fisiológico de las inmunoglobulinas de suero porcino empleadas como aditivo alimentario en un modelo murino para lechones. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora. Agosto.
13. Censo Agrícola-Ganadero y Ejidal. 1960. Accesado 30 de noviembre del 2003. <http://www.inegi.gob.mx/est/default.asp?c=1640>.
14. Censo Agropecuario (VII). 1991. Accesado 30 de noviembre del 2003. <http://www.inegi.gob.mx/est/default.asp?c=1640>.
15. Charteris, W.P., P.M. Kelly, L. & J.K. Collins 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. Lett. Appl. Microbiol. 26: 333-337.
16. Close, W. 2000. Producing pigs without antibiotic growth promoters. Advances in Pork Production. 11: 47-56.
17. Corona, V. 2001. Aislamiento e identificación de *Bifidobacterium* sp. a partir del contenido gástrico del cerdo. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. Agosto. Hermosillo, Sonora.
18. Crociani, F., B. Biavati, A. Alessandrim, C. Chiarini, & V. Scardovi. 1996. *B. inopinatum* sp.nov. and *B. denticolens* sp.nov. Two new species isolated from human dental caries. Int. J. of Syst. Bacteriol. 46:564-571.
19. Dong, X., Y. Xin, W. jian, X. Liu & D. Ling. 2000. *B. thermoacidophilum* sp. nov. isolated from an anaerobic digester. Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol. 50:119-125.
20. Donohue, D.C., S. Salminen & P. Marteau. 1998. Safety of probiotic bacteria. En: Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. S. Salminen & Atte von Wright ed. Marcel Dekker editorial. Finlandia. Pág. 369-383.
21. Doyle, M.E. 2001. Alternatives to antibiotic use for growth promotion in animal husbandry. Food Research Institute. Abril 2001.
22. Dunne, C., L. Murphy, S. Flynn, L. O'Mahony, S. O'Halloran, M. Feeney, D. Morrissey, G. Thornton, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, E. M.M. Quigley, G. C.O'Sullivan, F. Shanahan & J. Kevin. 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. Antonie van Leeuwenhoek. 76:279-292.

23. Dunne, C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrison, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. O'Sullivan, F. Shanahan & J.K. Collins. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(Supl.): 386S-392S.
24. Fahey, J.L. & E.M. McKelvey. 1965. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody agar plates. *J. Immunology*, 94: 84.
25. Fedorka-Cray, P. J., J. S. Bailey, N.J. Stern, N.A.Cox, S. R. Ladely & M. Musgrove. 1999. Mucosal competitive exclusion to reduce *Salmonella* in swine. *Journal of Food Protection*. 62(12): 1376-1380.
26. Feuchter, F. 2000. Problemática de la porcicultura en el noroeste de México. *Síntesis Porcina*, Sep-Oct. 20-24.
27. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Applied Bacteriol.* 66: 365-378.
28. Fuller, R. 1999. Probiotics for far animals. En: *Probiotics. A critical Review*. Horizon Scientific Press. Wymondham, U.K. Pág. 15-43.
29. Garriga, M., & M. Hugas. 2000. Probióticos en nutrición animal, XII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Oviedo, España. 18, 19, 20 de septiembre del 2000.
30. Gibson, G.R. & X. Wang. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Applied Bacteriol.* 77: 412-420.
31. Gomes, A. M.P. & F.X., Malcata. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10:139-157.
32. Gómez, G.A. 2001. Obtención de anticuerpos anti-inmunoglobulina A secretora (IgA) y su aplicación en un método inmunoquímico para su cuantificación en leche porcina. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora. Mayo.
33. Gómez, G.G., O. Phillips, & Goforth. 1998. Effect of immunoglobulins source on survival, growth and hematological and immunological variables in pigs. *J. Anim. Sci.* 76:1-7.

34. Gómez-Zavaglia, A., G. Kociubinski, P. Pérez & G. De Antoni. 1998. Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. *J. Food Prot.* 61(7):865-873.
35. Gomez-Zavaglia, A., G. Kociubinske, P. Pérez, E. Disalvo & G. De Antoni. 2002. Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. *J. Applied Microbiol.* 93: 794-799.
36. Gonzalez, S.N., M.C. Apella, N.C. Romero, M.E. Nader De Maclás & G. Oliver. 1993. Inhibition of enteropathogens by lactobacilli strains used in fermented milk. *J. Food. Prot.* 56(9):773-776.
37. Granillo, S. 2003. Caracterización de especies de bacterias ácido lácticas por medio de la técnica de amplificación al azar de fragmentos polimorficos de ADN (RAPD), utilizando PCR. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, Diciembre.
38. Hillman, K. 2001. Growth promoter: alternatives. <http://www.pighealth.com/News99/GROWTH2.HTM>, 06 de marzo del 2002.
39. Hintze, J.L. 2000. NCSS User's guide I, II, III. Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, USA.
40. Holt, J., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, & S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, edición 9. Lippincott Williams and Wilkins (editores). A Wolters Kluwer Compañy. Ballimore, USA. Pág. 573-574.
41. Hoyles, L., E. Inganäs, E. Falsen, M. Drancourt, N. Weiss, A.L. McCartney & M.D. Collins. 2002. *Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 995-999.
42. Ibrahim, S. & A. Bezkorovainy. 1993. Survival of bifidobacteria in the presence of bile salt. *J. Sci.* 62:351-354.
43. Ibrahim, S. & M. M. Salameh. 2001. Simple and rapid method for screening antimicrobial activities of *Bifidobacterium* especies of human isolates. *J. Rapid Methods and Automation in Microbiology.* 9:53-62.
44. Ishibashi, N. & S. Yamazaki. 2001. Probiotics and safety. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(suppl.):465S-470S.

45. Isolauri E., E. Salminen & S. Salminen. 1998. Lactic acid bacteria and immune modulation. En: Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. S. Salminen & Atte von Wright ed. Marcel Dekker editorial. Finlandia. Pág. 255-268.
46. Jonson, E. & P. Conway. 1992. Probiotics for pigs. Probióticos. The Scientific Basis. R. Fuller ed. Chapman and Hall editorial. Gran Bretaña.
47. Jurgens, M.H., R.A. Rikabi & D.R. Zimmerman. 1997. The effect of dietary active dry yeast supplement on performance of sows during gestation, lactation and their pigs. J. Anim. Sci. 75:593-597.
48. Kociubinski G., P.F. Pérez, M.C. Añón, G.L. De Antoni. 1999. A method for the screening of lactic acid bacteria with high inhibitory power. J. Food Protection. 59: 739.
49. Kumar, V. & R.S. Cotran, S.L. Robbins. 2001. Patología Humana. Mc. Graw Hill Interamericana. Mexico. 4-64, 513-562.
50. Kürti, P. 2001. Microbial balance and optimal digestion in pigs. International Pig Topics. 16(7):17-19.
51. Lauer, E. 1990. *Bifidobacterium gallicum* sp. nov. Isolated from human Feces. Int. J. of Syst. Bacteriol. 40:100-102.
52. Lee, K.Y., & T.R. Heo. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate bead in simulated gastric juices and bile salt solution. App. Environ. Microbiol. 66(2):869-873.
53. León J. 1992. Los antimicrobianos en la promoción del crecimiento y conversión alimenticia del cerdo (I). Síntesis Porcina. Febrero 28:13-19.
54. López Cervantes, G. Laboratorio de Patología. Hospital Infantil del Estado de Sonora.
55. Lyons, T.P. 1987. Probiotics: and alternative to antibiotics. Pig News Infor. 2:2-9.
56. MacFarlane, G.T. & J.H. Cummings. 1999. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health?. BMJ. 318: 999-1003.
57. Mantecón, T. & A. Ahumada. 2000. Diarrea mecánica de porcino en lactación y postdestete. Mundo Ganadero. 119.

58. Meile, L., W. Ludwig, U. Rueger, C. Gut, P. Kaufmann, G. Dasen, S. Wenger & M. Teuber. 1997. *Bifidobacterium lactis* sp.nov. a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Syst. Appl. Microbiol.* 20:57-64.
59. Mengheri, E., F. Nobili, F. Vignolini, M. Pesenti, G. Brandi & B. Biavati. 1999. *Bifidobacterium animalis* protects intestine from damage induced by zinc deficiency in rats. *J. Nutr.* 129:2251-2257.
60. Miller-Catchpole, R. 1989a. Morphology of bifidobacteria. En: *Biochemistry and Physiology of Bifidobacteria*. A. Bezkorovainy & R. Miller-Catchpole (editores). CRC Press (Editorial). Boca Ratón, Florida. Pág. 73-89.
61. Miller-Catchpole, R. 1989b. Bifidobacteria in clinical microbiology and medicine. En: *Biochemistry and Physiology of Bifidobacteria*. A. Bezkorovainy & R. Miller-Catchpole (editores). CRC Press (Editorial). Boca Ratón, Florida. Pág. 177-197.
62. Montijo, A. 1995. La porcicultura de Sonora ante el TLC. *Nuestro Acontecer porcino*. 3(2): 58-60.
63. Morilla, A. 1989. *Inmunología Veterinaria*. Ed. Diana. México, D.F. Pág. 155-173, 309-317.
64. Mulder, R.W.A.W., R. Havenaar & H. Huis in 't Veld. 1997. Intervention strategies: the use of probióticos and competitive exclusion microfloras against contamination with pathogens in pigs and poultry. En: *Probiotics 2: Application and Practical Aspects*. R. Fuller editor. Chapman & Hall. Pág. 187-205.
65. Naidu, A.S., W.R. Bidlack & R.A. Clemens. 1999. Probiotics spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 38(1):13-126.
66. Nousiainen J. & J. Setälä. 1993. Lactic acid bacteria as animal probiotics. En: *Lactic Acid Bacteria*. S. Salminen et A. Von Wright ed. Marcel Dekker. Inc. New York. Pág. 437-471.
67. Orban, J.I. & J.A. Patterson. 2000. Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. *J. Microbiol. Methods*. 40:221-224.

68. O'Riordan, K. & G.F. Fitzgerald. 1998. Evaluation of bifidobacterial for the production of antimicrobial compounds and assessment of performance in cottage cheese at refrigeration temperature. *J. Applied Microbiol.* 85:103-114.
69. Oropeza, M.I., E. Posadas, J.M. Cervantes, & O. Ortiz. 1998. Prevención de afecciones gastrointestinales mediante el uso de probióticos en becerros Holstein lactantes. *Vet. Méx.* 29(2):197-201.
70. Ouwehand, A.C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*. S. Salminen & Atte von Wright ed. Marcel Dekker editorial. Finlandia. Pág. 139-159.
71. Ouwehand, A.C., P.V. Kirjavainen, C. Shortt & S. Salminen. 1999. Probiotics: mechanism and established effects. *International Dairy Journal*. 9: 43-52.
72. Percival, M. 1997. Choosing a Probiotic Supplement. *Clinical Nutrition Insights*. 6(1): 1- 4.
73. Perdigón, G. & Pesce de Ruiz Holgado, A. 2000. Probiotics 3. Immunomodulation by the Gut Microflora and Probiotics. Fuller, R. & G. Perdigón editors. Kluwer Academic Publisher. Netherlands. Pág. 213-229.
74. Pérez, C. 2002. www.revista-anaporc.com, 12 de marzo del 2003.
75. Pollmann, D.S., D.M. Danielson, W.B. Wren, E.R. Peo, jr. & K.M. Shahani. 1980. Influence of *Lactobacillus acidophilus* inoculum on gnotobiotic and conventional pigs. *J. Ani. Sci.* 51(3):629-637.
76. Pot, B., W. Ludwig, K. Kersters & K. Schleifer. 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Microbiol. Genetics and Applications*. L. de Vuyst and E.J. Vandamme. Chapman and Hall (eds). London U.K. Pág. 13-59.
77. Poupard, J. A., I. Husain & R.F. Norris. 1973. Biology of the bifidobacterias. *Bacteriology Reviews*. 37(2): 136-165.
78. Prasad, J., H. Gill, J. Smart & P.K. Gopal. 1998. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy Journal*. 8:993-1002.
79. Rangel, J.A. 1994. Evaluación de dos probióticos en lechones recién nacidos. Tesis de licenciatura. UNAM. Cuautitlan Izcalli, Edo. De México.

80. Riverón R.L. 1999. Fisiopatología de la diarrea aguda. *Revista Cubana Pediátrica*, 71(2):86-115.
81. Rodríguez, A. 2002. Disminución de olores: un rompecabezas para la sociedad y para los productores. *Los porcicultores y su entorno*. 5 (27): 39-46.
82. Roy D. & Ward P. 1990. Evaluation of rapid methods for differentiation of *Bifidobacterium* species. *J. App. Bacteriol.* 69:739-749.
83. SARGARPA. 2003. www.sagarpa.gob.mx/. 12 de marzo del 2003.
84. Scardovi, V. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt (editores) Williams and Wilkins (editorial). Baltimore, London, los Angeles, Sydney, Pág. 1418-1434.
85. Scheleifer, K.H. & W. Ludwig. 1995. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. En: *The Genera of Lactic Acid bacteria*. B.J.B. Wood & W.H. Holzapel. Blackie Academic & Professional. Gran Bretaña. Pág. 7-15.
86. Shiba, T., Y. Aiba, H. Ishikawa, A. Takagi, T. Mine & Y. Koga. 2003. The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacteroides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. *Microbiol. Immunol.* 47(6):371-378.
87. Stephano & Asociados, S.A. de C.V. 1999. El uso de antimicrobianos en animales. *Los Porcicultores y su entorno*. Año 2 (8):22-23.
88. Stewart, C.S., K. Hillman, F. Maxwell, D. Kelly & T.P. King. 1993. Recent advances in probiosis in pigs: observations on the microbiology of the pig gut. En: *Recent Advances In Animal Nutrition*. Garnsworthy P.C., J. Wiseman & W. Haresign. Nottingham University Press. Pág. 197-220.
89. Teubner, H. 2002. Einfluß verschiedener lichtintensitäten und- qualitäten auf den melatonin- und IgA- spiegel im speichel und auf das verhalten von jungschweinen. Tesis doctoral. Ludwig Maximilians Universität München. München. Febrero.
90. Thomson, J. 2002. Etiología y control de las enfermedades entéricas en porcino. www.revista-anaporc.com. 12 de marzo del 2003.

91. Tizzard, I.R. 1996. *Inmunología Veterinaria*. 5ª edición. Mc Graw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México. Pág. 254-269.
98. Tizzard, I.R. 2000. *Veterinary Immunology: an Introduction*. 6th ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia Pennsylvania. USA
92. Tortuero, F., J. Rioperez, E. Fernández & M.L. Rodríguez. 1995. Response of piglets to oral administration of lactic acid bacteria. *J. Food. Prot.* 58(12): 1369-1374.
93. Velásquez, M. & J. M. Feirtag. 1997. Isolation and partial physiological characterization of comercial strains of bifidobacteria. *J. Food. Prot.* 60(5):537-543.
94. Watabe, J., Y. Benno & T. Mitsuoka. 1983. *Bifidobacterium gallinarum* sp. nov: a new specie isolated from the ceca of chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33:127-132.
95. Wilson, M.R. 1974. Immunologic development of the neonatal pig. *J. Anim. Sci.* 38(5):1018-1020.
96. Windschittl, P.M., K.M. Randall, & D.J. Brainard. 1991. Growth performance of Holstein dairy calves supplemented with a probiotic. *Agricultural and Forestry Experimental Station*. Vol. 22.
97. Yen, J.T. 2001. *Biology of the domestic pig*. Wilson H. Pond, Harry J. Mersmann. Cornell University Press. USA. 391-453.
98. Yusof, R.M., F. Haque, M. Ismail & Z. Hassan. 2000. Isolation of *Bifidobacteria infantis* and its antagonistic activity against ETEC O157 and *Salmonella typhimurium* S-285 in weaning foods. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 9(2): 130-135.
99. Zani, J.L., F. Weykamp da Cruz, A. Freitas dos Santos & C. Gil-Turnes. 1998. Effect of probiotics CenBiot on the control of diarrhoea and feed efficiency in pigs. *J. App. Microbiol.* 84:68-71.