

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA BIOTA INTESTINAL INDÍGENA, PARA LA OBTENCIÓN DE BIOPREPARADOS CON PROPIEDADES PROBIÓTICAS EN CERDOS.

**Dr. MV. Vladimir Barrios González¹, Dra. C. Lic. Luz María Samaniego Fernández¹
Dra. C.Dr. MV. Ana Carvajal Urueña²; Dr. C. Lic. Biot. Mario Arcos², Dr. C. Dr.
MV. Pedro Rubio Nistal², Dr. C. Dr. MV. Germán Naharro Carrasco² Ing. Marta
Laurencio Silva¹, Dr. C. Ing. M. Pérez Quintana¹, Dr. C. Dr. MV. R. Boucourt
Salabarría³, Dr. C. Dr. MV. Lourdes Savón Valdéz³, Dr. MV. Hanoi Domínguez
Carrillo¹.**

*1.Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, Vía Blanca Km.3,
Matanzas, Cuba.*

*2.Facultad de Medicina Veterinaria (FMV). Universidad de León (UL). Campus de Vegazana.
Comunidad autónoma de Castilla y León. España.*

3.Instituto de Ciencia Animal de la Habana (ICA).Carretera central. La Habana. Cuba.

Resumen

Es de crucial importancia el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas del intestino de cerdos para la generación de biopreparados con potencialidad probiótica y farmacológica a partir de las mismas. Actualmente se aíslan y obtienen bacterias lácticas de múltiples sustratos ya sea a partir de alimentos, del medio ambiente o simplemente se encuentran en colecciones o ceparios de dichas bacterias. Estas cuando se obtiene “in situ” en el propio hospedero o animal simbiótico ya tienen un valor superior caracterizado este por la adaptabilidad y resistencia adquirida por el entorno donde se desarrollan, adhiriéndose y reproduciéndose en dicho ecosistema. Durante la recopilación se valoran diferentes trabajos relacionados con el aislamiento de cepas de bacterias ácido lácticas de mucosas intestinales y de heces fecales así como su identificación bioquímica y molecular.

Palabras claves: Probióticos; Lactobacilos; aislamiento; cerdos; PCR; mucosas..

I. Introducción

En la actualidad los probióticos han adquirido relevancia en las condiciones de producción porcina, por la sustitución creciente que han sufrido los antibióticos y los promotores hormonales del crecimiento en nuestros sistemas productivos. Incontables son los argumentos que perfilan estas decisiones a los líderes en el mercado de los alimentos, ya sea por la resistencia a los productos antimicrobianos que sufren indirectamente los seres humanos, así como por los residuales y potenciales agentes carcinogénicos que perjudican no solo la salud animal, sino también al principal consumidor y beneficiario de los derivados de la producción animal: “el hombre”. Es de vital importancia conocer que el sistema digestivo, en su fisiología, integra a más del 70% del funcionamiento del sistema inmunológico (Pérez, 2000), el cual se decide en el equilibrio microbiano proveniente del intestino grueso (ciego y colon). Además se conoce que en la mucosa gastrointestinal se adhieren ciertos microorganismos (más de 200 millones de especies) que contribuyen a mantener el equilibrio microbiano, por lo cual, ésta se considera como un sistema homeostático particular.

La importancia fundamental del aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas del intestino de cerdos tiene sus bases en la necesidad del estudio de la composición de la flora microbiana presente en el tracto gastrointestinal (TGI), fundamentalmente de la beneficiosa con el objetivo de estudiar y diseñar biopreparados probióticos, así como determinar todas las medidas zootécnicas, clínicas y epizootiológicas para el cuidado y protección de este micro ecosistema intrínseco (MEI) en nuestros animales de interés productivo, así como en el hombre.

Estudios efectuados durante los últimos 50 años (Vandelle et al. 1990; Gedek, 1991; Mulder 1996, Piad 2001) han demostrado que la biota intestinal en los animales de granja está constituida por tres grandes grupos de microorganismos: la llamada Biota principal, constituida por más del 90% del total de microorganismos, principalmente por anaerobios estrictos u obligados; entre los que se encuentran las bacterias formadoras de ácido láctico (BAL) (lactobacilos, bífidobacterias y estreptococos) y las bacterias formadoras de ácidos

grasos (bacteroides y eubacterias); la Biota secundaria, que constituye menos del 1% y está conformada principalmente por anaerobios facultativos (enterobacterias: principalmente *E. coli* y *Enterococcus* spp.) y la Biota residual, que constituye menos del 0.001% y está integrada por *Clostridium*, *Proteus*, estafilococos, *Pseudomonas* y levaduras como las *Candida* spp., así como por otras especies patógenas o facultativamente patógenas.

En el procesamiento y elaboración de piensos para la nutrición porcina, con tecnología y productos cubanos o con subproductos de importación, no se administran probióticos de forma masiva ni extensiva. Entre las causas fundamentales de este proceder se encuentran: la no existencia de productos probióticos basados en BAL aisladas directamente del TGI de cerdos, que sean de factura nacional y posean efectividad y factibilidad probada. Dicho fenómeno se encuentra antecedido por la carencia de estudios existentes sobre los microorganismos beneficiosos del sistema digestivo del cerdo, por tanto, no existe, en Cuba, un cepario clasificado (como base fundamental) de microorganismos con potencialidad probiótica que permita desencadenar procesos investigativos en dicha línea. Esto ha provocado que, en determinadas ocasiones, se importen niveles de probióticos o tecnologías (ejemplo: SORBIAL) a precios sumamente altos.

Algunos investigadores cubanos pertenecientes al Instituto de Ciencia Animal (ICA), Instituto de Investigaciones Porcinas (IIP), Universidad de Matanzas, Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO), Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), el Instituto Cubano de Investigación de la Caña de Azúcar (ICIDCA) y la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey (EEPFIH) han demostrado la importancia de la aplicación y suplementación de probióticos en la salud y producción animal. Para ello se ha trabajado en su mayoría con productos importados o no provenientes del propio tracto digestivo de animales tropicalizados e incluso con cepas provenientes de ceparios, lo cual dificulta su factibilidad económica y aplicabilidad funcional en términos de factibilidad práctica. Permitiendo obtener resultados alentadores pero que no muestran todo el potencial existente en la isla.

En Cuba se realizan grandes esfuerzos por incrementar los niveles productivos en la rama animal, siendo este un sensible renglón económico de real importancia para la población, no sólo por los niveles de proteína que aporta la carne, sino también como parte de la cultura y los hábitos alimentarios de nuestra población. “No es posible aspirar a tener producciones eficientes y cuantiosas si no se introducen sistemáticamente los avances tecnológicos y se aplican los resultados de las investigaciones de avanzada sobre la nutrición y salud animal”.

El uso de los probióticos se ha propuesto recientemente como una alternativa al empleo de los antibióticos. Estos últimos constituyen el método usual para eliminar microorganismos indeseables que afectan la salud animal y humana; sin embargo, su uso extensivo e indiscriminado ha provocado el desarrollo de cepas patógenas resistentes. La industria farmacéutica no es capaz de desarrollar antibióticos efectivos en un grado suficiente como para competir con el incremento sostenido de la resistencia microbiana. Además, durante la cría y explotación porcina se incurre en altos costos por la utilización de antibióticos, que no sólo deben ser analizados desde el punto de vista económico, pues se debe tener en

cuenta que su empleo daña en gran medida la flora protectora de los animales y por tanto, predispone a enfermedades ulteriores.

Existen diferencias palpables y apreciadas entre probióticos y antibióticos. Desde su principio preventivo de utilidad con respecto a su utilidad terapéutica. La terapia basada en el uso de probióticos tiene sus ventajas y debilidades al igual que la terapia basada en antibióticos. El conocimiento científico-práctico de los especialistas radica en conocer el momento en que resulte más beneficioso el empleo de una u otra de estas terapias o de ambas inclusive. Para los productores debe resultar más importante evitar que sus animales enfermen por trastornos previsibles, mediante el suministro profiláctico de probióticos, que incurrir imperiosamente en gastos terapéuticos por concepto de antibioterapia. Teniendo en cuenta lo antes planteado, el objetivo del presente trabajo es obtener, aislar e identificar bacterias ácido lácticas del tracto gastrointestinal y las heces fecales de cerdos saludables para estudios posteriores como candidatos a probióticos de factura nacional, así como presentar algunos resultados preliminares de este proceder.

Desarrollo

Algunos aspectos de la microbiología del TGI del cerdo y de las afectaciones más frecuentes en la cadena productiva.

Hasta el momento de nacer, el aparato digestivo del feto de los mamíferos o del embrión de las aves es estéril. La colonización microbiana, sin embargo, es extremadamente precoz y rápida alcanzando cifras próximas a los 10¹⁰ microorganismos por gramo de heces a partir de las 48 horas del nacimiento.

Un 20% de esta biomasa microbiana permanece sin identificar, y aun cuando las bacterias están representadas fundamentalmente por enterobacterias y anaerobios (facultativos y estrictos) las variaciones entre las especies animales son muy amplias. Así, por ejemplo, el intestino de los gazapos (conejos) carece de lactobacilos en las primeras semanas de edad según investigaciones efectuadas por (Salminen, et al 1996).

En un esfuerzo de simplificación, las diferentes poblaciones bacterianas del tracto digestivo pueden clasificarse en bacterias "beneficiosas", entre las que destacan los lactobacilos y las bifidobacterias, y "perjudiciales" donde encontramos a los coliformes, las salmonellas y las campylobacter (Gibson 2000). Las primeras son aquellas a ocupar micro nichos en el intestino y competir con las bacterias o actividades microbianas más negativas.

En condiciones normales, la población microbiana de un animal sano es relativamente estable sin embargo, variaciones en las condiciones ambientales (mayor o menor carga microbiana en el medio, cambios de temperatura ambiente, stress) o en las características de la dieta, en particular en lo que se refiere tanto a la carga microbiana del pienso como a su resistencia a la digestión enzimática puede determinar cambios en la actividad microbiana del tracto digestivo, y en el riesgo de sufrir alteraciones digestivas. Estas alteraciones además suelen ser diferentes, dependiendo del estado sanitario inicial de los animales (Zhou et al, 2005).

Las afectaciones de la biota intestinal que más inciden en los indicadores productivos están en crías y destetes porcinos como consecuencia de factores estresantes y otras causas que pueden interferir en el establecimiento de una biota gastrointestinal normal y alterar su equilibrio (Carvajal 2002; Vandelle et al. 1990). El desequilibrio normal de esta, ocasionaría una mayor incidencia de enfermedades y una disminución de los niveles de producción esperados (Álvarez y Oberhelman 2001; Mosson 2001; Swientek 2003).

Los problemas entéricos, especialmente en las crías, son de las principales causas de pérdidas económicas en la industria porcina, cunícula, bovina, avícola y ganadera en general. La totalidad de las granjas productivas utilizan antibióticos de manera terapéutica y sub terapéutica para controlar estos problemas, pero se debe incidir en la búsqueda de otros aditivos, que ofrezcan mejores o similares beneficios que los antibióticos y que a su vez no sean perjudiciales para los animales ni el hombre (Choct, 2001).

La solución más adecuada para asegurar el rendimiento de la alimentación, con la consecuente ganancia de peso y aumento de la inmunología natural del animal, es la prevención de las variaciones de la biota, asegurando la presencia de un número suficiente de bacterias beneficiosas, capaces de dominar el medio e inhibir el desarrollo de los patógenos. Una biota bacteriana uniforme y sana en el intestino, garantiza el óptimo aprovechamiento de las mezclas correctamente balanceadas para la alimentación animal. Variaciones en la calidad de la biota intestinal pueden producir variaciones en el índice de conversión de hasta el 10% (Choct, 2001).

Las crías al nacer, quedan expuestas a la acción de los microorganismos presentes en el ambiente que les rodea y además, entran en contacto con las heces maternas, las cuales contienen bacterias que colonizan su tracto digestivo. Estas bacterias buscan un nicho adecuado, en el que compiten e interaccionan entre sí, constituyendo finalmente una población relativamente estable y compleja que representa la biota intestinal normal. No obstante la estabilidad de la biota intestinal en monogástricos (aves, cerdos) puede ser alterada por cambios dietéticos o ambientales importantes (Ramírez et al 2005).

Las enfermedades relacionadas con la nutrición son muchas y en ocasiones transcurren sutilmente. Estas pueden estar causadas por carencias, desequilibrios de los nutrientes, o defectos en la asimilación de los productos que se originan como resultados de la digestión o del metabolismo o por intoxicaciones. Según se establecen normas de profilaxis sanitarias que combate a los gérmenes en el medio exterior y crean mecanismos contra la contaminación y la profilaxis médica que combate a los gérmenes en el propio organismo animal, utilizando los mecanismos de autodefensa; también deben establecerse normas alimentarias para evitar lo más posible la entrada de enfermedades “por la boca” o sea, derivadas de la nutrición (Alonso et al, 2004).

La alimentación, es uno de los principales factores que determinan el comportamiento productivo del cerdo y requiere del 60-70 % del costo total de producción. Es también compartido el criterio de los animales en ceba (cerdo, bovinos, equinos, bufalino) deben ser criados y alimentados con la máxima intensidad posible a fin de poder aprovechar su alto potencial biológico para consumir los alimentos y transformarlos en productos útiles y deseados por el hombre (Alonso et al , 2004).

La importancia de esta entidad está determinada principalmente por las pérdidas económicas que son cuantiosas, pérdidas por muerte o sacrificios de animales, disminución de la ganancia en peso y la conversión, pérdidas de gastos de medicamentos, atención veterinaria, medidas de lucha y control, vacunación y el aumento de la susceptibilidad a otras infecciones

Algunos comentarios sobre el uso de probióticos en la crianza porcina.

Según (Goldin y Gorbach 1992) durante la etapa de cría y las primeras semanas post-destete es donde ocurren en la producción porcina las mayores pérdidas como consecuencia de factores estresantes, con un promedio de pérdida del 10 al 25% de las crías, interviniendo estos factores en el establecimiento de una biota gastrointestinal normal y a la vez alteran su equilibrio, entre otros efecto (Ouwehand et al, 1999).

(Dunne et al 2001) refieren que estos a su vez ocasionan mayor incidencia de enfermedades y mortalidad así como una disminución de los niveles de producción esperados.

Los cerditos en los primeros días nacidos y jóvenes son más susceptibles a sufrir estrés que aquellos que se encuentran próximo al destete debido entre otras cosas a que su TGI es estéril al nacimiento, presentan una falta de capacidad adecuada para la acidificación (producción de HCl) en el estómago (Nousian, 2000).

(Schrezenmeir y Vrese 2001) describe que nacen aganmaglobulinémicos y tienen poco desarrollo de su mecanismo termorregulador y enzimático en el sistema digestivo hasta que no transcurran varios días de nacidos.

Estudios llevados a cabo por (Kristo et al. 2003) ponen de manifiesto que el aporte de un suplemento probiótico (*Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*) a las cerdas gestantes dos semanas antes del parto y durante la lactación puede reducir la mortalidad predestete, logrando además una mejora en la funcionalidad intestinal de los lechones, lo que repercute en un mayor peso al destete, en torno al 7%. Los microorganismos probióticos son transferidos de la cerda a la camada justo después del parto, produciéndose la colonización del tracto gastrointestinal con una biota estable que se mantiene con el contacto continuo de los lechones con las heces de la madre.

(Roberfroid 2000; Rosmini et al. 2004) utilizaron dos métodos de suministro de un probiótico a base de *L. acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* a crías porcinas, uno fue aplicándolo a las crías por vía oral 5 ml del producto ($11,2 \times 10^9$ u.f.c/ml) al nacimiento, 3 y 7 días de edad y a partir de los 14 días se le añadió al pienso en una proporción de 3 ml/cerda/día hasta el destete y el otro se le administró a la cerda diez días antes y 14 después del parto, a razón de 30 ml mezclado con el pienso. A partir de los 14 días se les suministró a las crías 3 ml diariamente hasta el final de la lactancia. Obtuvieron una mejora significativa en el peso al destete (final), incremento en peso, GMD, conversión del pienso, la morbilidad y la mortalidad por diarreas en los dos grupos tratados con relación al control.

(Abad et al 1995) tras la administración oral de *Bifidobacterium pseudolongum* y *Lactobacillus acidophilus* a cerditos lograron una mejora significativa en la GMD durante el período de lactancia y en el post destete, con relación al grupo control. Estos mismos

autores demostraron un efecto más evidente en el período de lactancia que en el post destete, destacaron además que en condiciones de alimentación sin antibióticos la frecuencia de mortalidad de los cerditos decreció marcadamente por la administración de probióticos.

(Piad 2001) al realizar la evaluación de la actividad probiótica de un hidrolizado enzimático de crema de destilería (*Saccharomyces cerevisiae*) en pollitas de reemplazo de ponedora, obtuvo un mejor comportamiento en todos los indicadores productivos evaluados para los tratamientos con hidrolizado los que difirieron del control ($P < 0.001$).

(González 2005) Al evaluar la actividad probiótica de un aditivo a base de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus* en cerdos Jóvenes a una concentración de (109 ufc) encontró que los animales que consumieron el aditivo mostraron diferencias ($P < 0.001$) en los pesos al nacimiento, en la tasa de ganancia media diaria hasta los 33 días ($P < 0.01$) y en un mayor peso al destete ($P < 0.01$) con respecto al control.

La mortalidad en los cerditos lactantes es aproximadamente del 20% dado a su inmadurez inmunológica (Steward, 2002). Un 41.5% de la mortalidad corresponde a enfermedades diarreicas y de ellas un 25.5 ocasionadas por *E. coli* (Hoa et al, 2001).

Una de las vías para disminuir la mortalidad de los cerditos recién nacidos lo constituye el uso de probióticos en forma preventiva o profiláctica. Se obtuvieron resultados alentadores cuando se utilizó en una granja porcina una mezcla de *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus acidophilus* aislados de cerdo, se observó una diferencia en los parámetros zootécnicos estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en favor del grupo tratado (Casula y Cutting, 2002).

Los preparados probióticos en la crianza porcina se pueden administrar inmediatamente después del nacimiento de los cerditos, en períodos en que el productor espera la aparición de enfermedades (preventivo o curativo) o mezcladas con el alimento por largos períodos de tiempo. Los microorganismos pueden ser ingeridos oralmente o mediante su adición en el agua o el alimento, el cual a su vez puede estar peletizado o molido. Las preparaciones pueden administrarse heladas, liofilizadas, en forma de pastas (Nicholson et al. 2000), o como productos de la fermentación con o sin organismos viables (Oullivan, 2004).

La forma de presentación dependerá de la conveniencia para su distribución y administración, por ejemplo: si la actividad metabólica es necesaria para su acción efectiva, los microorganismos deben permanecer viables o en algunos casos pudieran atravesar el TGI sin necesidad de colonizarlo pero ejerciendo actividad inmunomoduladora o simplemente activadora de la biota indígena presente, tal es el caso de los glucanos y mananos provenientes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Biricik, 2001) el cual tiene efectos prebióticos tanto en monogástricos como en rumiantes. Los probióticos pueden ser suministrados a los cerdos en diferentes edades en dependencia de su función o mecanismo de acción. Suponiendo que la biota indígena normal del cerdo no ha sido establecida aún, las preparaciones a partir de *Lactobacillus* spp. son muy adecuadas debido a que se iniciaría la colonización secuencial natural del intestino

En lugares con alta incidencia de enfermedades diarreicas es apropiado introducir una cepa probiótica tan pronto sea posible de forma tal que se garantice la colonización del intestino con la cepa probiótica capaz de inhibir al patógeno. En cuanto a si se debe usar una sola dosis o dosis continuadas se plantea que esto está en dependencia de las características y mecanismos de acción de la cepa a ser utilizada como probiótico. Analizando el estudio realizado por Bomba (1998) si se desea que la acción sea la de producir metabolitos en el tracto gastrointestinal a través de su paso por este sistema y no la capacidad de colonizar, entonces es necesario el uso de dosis diarias continuadas. Sin embargo, si el mecanismo de acción es el de facilitar la colonización del tracto por la presencia en la cepa de adhesinas específicas, con dosis simples puede ser suficiente hasta que el cerdo sea expuesto a condiciones de estrés que provoquen la pérdida de la cepa probiótica.

Las dosis terapéuticas más frecuentemente empleadas en cerdos recién nacidos para inhibir la adhesión de la *Echerichia coli* entero patogénica están sobre 10^9 a 10^{12} microorganismos por animal por día o de 10^6 a 10^7 por gramo de alimento (Jin et al, 2000). Cuando se precisa alcanzar un cierto nivel de bacterias en el intestino delgado, se debe tener en cuenta la muerte en el estómago y la dilución provocada por las enzimas digestivas (Mosson, 2001).

Lo fundamental en las dosis es que el número de microorganismos administrado debe ser suficiente para provocar una respuesta beneficiosa en el hospedero y encontrarse en un nivel significativo con relación a la biota indígena o alcanzar este nivel por crecimiento dentro del tracto digestivo. Reflexionaremos que uno de los principales objetivos del uso de probióticos es aumentar el crecimiento y la salud de los animales. Para ejercer algún efecto beneficioso, las bacterias o posiblemente las sustancias activas deben alcanzar el sitio adecuado, por lo que primero que todo ellas deben ser consumidas. Esto significa que las preparaciones deben ser apetecibles o al menos no repulsivas al cerdo. Los cerdos son muy sensibles al sabor y a la textura de sus alimentos (Neumann, 1998).

El otro menester importante es que la preparación debe poseer microorganismos viables o sustancias activas en cantidades suficientes. Una de las razones para el uso de las BAL como probióticos es que son capaces de estabilizar la biota intestinal y competir con los microorganismos patógenos debido a la capacidad de producir ácido láctico y por consiguiente facilitar un descenso del pH y un decrecimiento en el número de bacterias patógenas entéricas en el intestino delgado de los cerdos recién nacidos. (Piloto et al, 2000 y Swientek, 2003).

Aspectos sobre la toma de muestras, procesamiento y aislamiento de BAL del TGI de cerdos.

En trabajos realizados por diferentes autores (Gómez y Graciela 2008) se plantea la identificación de las *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. en el marco de la taxonomía polifásica. Para ello se han utilizado métodos microbiológicos convencionales tales como el perfil de fermentación de azúcares y métodos moleculares, perfil de proteínas totales solubles y PCR. En algunos casos se han caracterizado dichas bacterias lácticas mediante BOX-PCR.

(Sakata et al, 2003) realizó estudios demostrando los beneficios de la producción de ácidos orgánicos de muchas bacterias pertenecientes a las BAL las cuales podemos encontrar a nivel intestinal adheridas en la mucina presente en la mucosa entérica. He ahí la necesidad efectuar raspados de esta para obtener la biota mejor adaptada a este nivel.

En trabajos realizados por (Quiles y Hevia 2003) en diferentes muestreos efectuados a lechones al 1er y 2do día de nacido, demuestran que en el tubo digestivo del lechón en el momento del nacimiento es generalmente estéril. Ambos investigadores plantean que normalmente, los lechones se encuentran estériles o exentos de microorganismos en el útero de la cerda aunque algunos patógenos pueden infectar a los lechones en el útero materno. Ahora bien, pasadas algunas horas ya podemos encontrar colonias de bacterias en el lechón procedentes bien de la propia cerda (fundamentalmente a partir de las heces y del canal del parto y del pezón) o bien de la sala de partos, de tal manera que, a las 12 horas de vida, ya podemos detectar en las heces de los lechones una cifra de 10⁸-10⁹ bacterias/g de heces, en conteos de colonias efectuados en diferentes tiempos con diluciones seriadas de 10⁻¹ hasta 10⁻¹². Estas bacterias buscan el nicho más adecuado, donde compiten e interaccionan entre sí, constituyendo finalmente una población relativamente estable y compleja que representa a la biota intestinal indígena (o saprófita) la cual comienza a establecerse a partir del 1er día de nacido.

Se pudo constatar por (Quiles y Hevia 2003) y (Yang et al 2003) que las primeras bacterias en colonizar el tubo digestivo son cepas no patógenas de *Escherichia coli*, *Clostridium welchii*, *Streptococcus faecium*, lactobacilos como el *Lactobacillus acidophylus* y *Bacteroides* spp., éstos últimos son los más numerosos del intestino grueso a partir del 2º día, junto con *Eubacterium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Fusobacterium* spp. y *Clostridium* spp., por el contrario, los lactobacilos son los más numerosos en el estómago y en el intestino delgado. La toma de muestras se efectuó en dichos estudios a partir de heces directas y contenido intestinal en crías libres de antibióticos y clínicamente sanas.

La colonización de bacterias como lactobacilos y estreptococos (*Lactobacillus fermentum* y *Streptococcus salivarius*) en el estómago está controlada por la secreción de ácido clorhídrico, manteniendo un pH relativamente bajo. Por eso, esta colonización en el lechón lactante tarda un poco en llevarse a cabo, aunque la producción de ácido láctico por parte de algunas bacterias puede contribuir a mantener este pH bajo. En el intestino delgado del lechón lactante se piensa que existen diferentes mecanismos de adhesión de la microbiota pues se han observado lactobacilos adheridos a células epiteliales e intestinales.

(Schierack et al 2007) aislaron de lechones a las 24, 48 y 72 horas de nacidos hasta el destete una biota variable principalmente de la familia enterobacteriaceae existiendo diferencias considerables en los diferentes segmentos entre la bacterias pertenecientes al grupo de la *Echerichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae* siendo en todos los casos la biota dominante a las pertenecientes a la familia de las enterobacteriaceae sin embargo muchos de las bacterias adheridas a la mucosa de la familia asociadas a la mucosa no fueron detectadas ni identificadas.

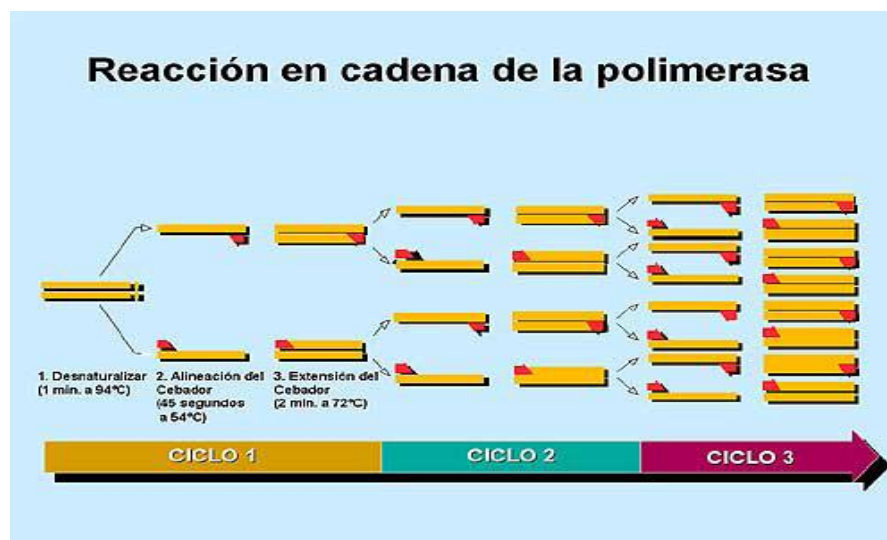
Comentarios sobre la metodología para la identificación de cepas de BAL. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la identificación bioquímica mediante Test API. Aspectos generales sobre las técnicas.

(Dieffenbach y Dveksler, 1995), describen que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de DNA específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de DNA. Se basa en la actividad de la enzima DNA polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de DNA complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio (adenina, timina, citosina y guanina), que son los componentes de la cadena de DNA, y una pequeña cadena de DNA (oligonucleótido) que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebador, (Miot-Sertie y Lonvaud-Funel 2006; Röder et al. 2007; Stender et al. 2001).

(Ballester et al. 2005) y (Guillamón et al. 1998) describen que la PCR se desarrolla en tres pasos. El primero es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de DNA que se quiere amplificar, para lo cual se debe calentar el DNA a una temperatura de 95-96 °C. Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementaria. A continuación se baja la temperatura para conseguir que cada cebador se una a su región complementaria dentro de la cadena de DNA. El último paso consiste en la generación de la cadena de DNA complementaria por acción de la DNA polimerasa. El problema con el que se encontraron los científicos que idearon esta técnica es que resulta preciso aumentar la temperatura de la mezcla de reacción hasta valores por encima de los 70°C para que las dos cadenas de DNA se mantengan separadas. A estas temperaturas tan elevadas la DNA polimerasa se inactivaba y era preciso añadirla de nuevo en cada ciclo.

Esto fue así hasta que se descubrió la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en aguas termales y cuya DNA polimerasa (Taq polimerasa) es capaz de trabajar a temperaturas superiores a los 70°C. De esta manera sólo hay que añadir la enzima al inicio del proceso de reacción y llevar a cabo tantos ciclos como sea necesario. Cada una de las moléculas de DNA hijas pueden volver a entrar en el proceso y servir como molde para fabricar más copias (Newton y Graham, 1994). Se consigue una amplificación de 2^n , siendo n el número de ciclos de reacción (ver la figura # 2).

Figura 2 Esquema ilustrado de los ciclos efectuados por el termociclador en la PCR



Tomado de Galván et al (2009)

(Galván et al 2009; Mills y Phister 2003) esbozan que la PCR es una técnica altamente compleja que permite diferentes aplicaciones, entre ellas:

Simplifica sobremanera muchos experimentos de ingeniería genética

Permite muchos estudios de expresión genética

Secuenciación directa de secuencias amplificadas

Detección de mutaciones

Diagnósticos de enfermedades genéticas e infecciosas

En ciencia forense: identificación de restos biológicos, determinación de paternidad, pruebas periciales en criminología, en arqueología y paleontología.

En microbiología permite la identificación de bacterias con una precisión superior al 99% siempre y cuando se cumplan las normas establecidas y procedimientos para dicha tecnología.

(Griffiths et al 1996) expone que al aplicar un campo eléctrico a una solución de moléculas con carga neta, éstas se desplazarán hacia el polo contrario a su carga. En este principio se basa la técnica denominada electroforesis y el desplazamiento de la molécula en cuestión depende de dos factores: la carga y el tamaño. La electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida y la agarosa. Estos geles van en una cuba, sumergidos en un tampón, con pH superior a 8. De esta forma, las moléculas de DNA o RNA sometidas a electroforesis se desplazarán al polo positivo, porque poseen carga neta negativa a valores de pH superiores a 5, (Antonishyn et al. 2007; Röder, 2007; Stender et al. 2001)

(Gonzalo 2009), subraya que los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. Las biomoléculas que pueden ser marcadores moleculares son las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el DNA (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida). Cuando varios marcadores moleculares se asocian inequívocamente con un rasgo genético, se dice que forman un QTL (loci de rasgos cuantitativos o cuantificables). Un marcador molecular mono mórfico es invariable en todos los organismo estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es polimórfico. A veces el grado de variación es tal que se denominan hipervariable.

Los primeros marcadores desarrollados a finales de los 70 se basaron en la identificación de proteínas e isoenzimas por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida. Con ellos se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades, y poblaciones de distinto origen geográfico. Pero esta técnica tenía una limitación muy importante: no era capaz de detectar suficiente polimorfismo entre

variedades o especies próximas debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra, de un medio ambiente a otro, y de una época del año a otra. Los avances de la tecnología del DNA recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el DNA, consiguiendo estabilidad en la identificación de especies y variedades, (Gonzalo 2009).

(Erlach 1989; Ibeas et al. 1996) plantearon que cuando la electroforesis se realiza en un gel, éste se comporta como un tamiz molecular y permite separar moléculas cargadas basándose en su tamaño y forma. Así una mezcla de moléculas de DNA de diferente tamaño, que pueden resultar de una reacción con enzimas de restricción, se separará en función de aquel. (Egli et al. 2001) y (Cocolin et al. 2004) plantearon que es importante el empleo de un marcador de tamaño conocido porque permite calcular la masa molecular de las bandas de DNA.

Conclusiones

Se demuestra la presencia de una flora láctica diversa en el intestino y las heces fecales de cerdos saludables, que puede ser considerada de utilidad para estudios posteriores como candidatos a probióticos. Se identifican como los géneros más frecuentes en el tracto digestivo y las heces fecales de cerdos saludables a los *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. y *Streptococcus* spp. , siendo los primeros predominantes en las literaturas consultadas. Será necesario el estudio, aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas del intestino de cerdos cubanos adaptados a nuestro ecosistema agro productivo con el objetivo de obtener cepas autóctonas que brinden mejores resultados como candidatos a probióticos de factura nacional.

Bibliografía

- Abe, M.; Matsunaga, M.; Iriki, T.; Funaba, M.; Honjo, T.; Wada, Y. 1999 *J. Dairy Sci.* 82, 320-332.
- Abad, F.; Ishibashi, N.; Shimamura, S. 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *JOURNAL*.
- Alonso Sáez, R.; Cama Gómez, J.M.; Rodríguez Gómez, J. 2004. *El Cerdo: Características de los principales sistemas de explotación*. La Habana. Edición Félix Varela. 44 p.
- Álvarez-Olmos, M.I.; Oberhelman, R.A. 2001. Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infection Diseases* 32: 1567-1576.
- Antonishyn NA, McDonald RR, Chan EL, Horsman G, Woodmansee CE, Falk PS, 2000. Evaluation of fluorescence-based amplified fragment length polymorphism analysis for molecular typing in hospital epidemiology: comparison with pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*; 38:4058-65. Vázquez AJ, Berrón S. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22:113-20.
- Ballester G. D, de Montaigu A, Galván A, Fernández E (2005) Restriction enzyme site-directed amplification PCR: a tool to identify regions flanking a marker DNA. *Anal Biochem.* 340: 330-335. Una aplicación de la técnica de PCR donde se describen los cebadores utilizados en esta práctica.
- Biricik, H. y Türkmen, I. 2001. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on in vitro rumen digestibilities of dry matter, organic matter and neutral detergent fibre of different forage: concentrate ratios in diets. *J. Fac. Vet. Med.* 20: 29.
- Bomba, V.A.; Gancariková, S.; Nemcová, R.; Herich, R.; Kastel, R.; Depta, A.; Demeterova, M.; Ledeck, V.; Zitnan, R. 1998. The effect of lactic acid bacteria on intestinal metabolism and metabolic profile of gnotobiotic pigs. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.* 105: 384 - 389.
- Carvajal, A. Problemas Entéricos. [en línea] julio 2002. Disponible en: malito.porcinocultura@porcinocultura.com [consulta: 20 junio 2009].
- Casula, G. y Cutting, S.M. 2002. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol*: 68: 2344 – 2352.
- Choct, M. 2001. Alternatives to in-feed antibiotics monogastric animal industry. *ASA Technical bulletin Vol. AN 30*.
- Cocolin L., Rantsiou, K., Lacumin, L., Zironi, R., Comi, G. 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1347-1355.

- Dieffenbach CW, Dveksler GS (1995) "PCR Primer. A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press. Un excelente y completo manual sobre la PCR.
- Dunne, C.; Mahony, L.; Murphy, L.; Thornton, G.; Morrissey, D.; Halloran, S.; Feeney, M. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J. Clin. Nutr*: 73(Suppl): 386 - 392.
- Egli, C. and Henick- Kling, T. 2001. *Am. J. Enol. Vitic.* 52: 241-247.
- Erlich, H.A. 1989. PCR technology: principles and applications for DNA amplifications. Stockton Press, NY, E.U.
- Galván C.A. Tejada M., Camargo A., Higuera J. J., Mariscal V., Fernández E.R. (2009) Comprobación de colonias transformantes mediante PCR y electroforesis Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba.
- Gedek B. 1991. Regulation of the intestinal flora through food. *Zbl. Hyg.* 191: 272-301. Public Works and Government Services Canada. Translation Services. Multilingual Translation.
- Gibson, G.R. 2000. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics. *Journal of Nutrition* 130 (2 Suppl): 391 - 395.
- Goldin, B.R.; Gorbach, S.L. 1992. Probiotics for humans. In: Fuller R, ed. Probiotics, the scientific basis. London: Chapman and Hall. p. 355 – 376.
- Gómez Z. A de Antoni Graciela 2008. Quimiotaxonomía de bacterias lácticas. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Tesis para la obtención del grado científico de Master en Ciencias.
- González L.M.V. 2005. Actividad probiótica de un aditivo a base de lactobacillus acidophilus y rhamnosus en credos jóvenes . Tesis presentada en opción al Grado Académico de Master en Ciencias Veterinarias. Instituto de Investigaciones Porcinas de la Habana . Cuba.
- Gonzalo C. D. 2009. Marcadores moleculares: Qué son, cómo se obtienen y para qué valen. Investigador Contratado en el Dpto. de Biología Molecular y Bioquímica (Universidad de Málaga) Consultado en www.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclean/plsc431/markers/ y opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MG01.html.
- Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin y W.M. Gelbart. 1996. An introduction to genetic analysis (6a. ed.). W.H. Freeman y Co., NY, E.U.
- Guillamón, J.M.; Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J. and Querol, A. 1998. *Arch Microbiol*, 169:387-392.

- Ho, T.T.; Duc, L.H.; Istatico, R. 2001. The fate and dissemination of *B. subtilis* spores in a murine model. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3819 – 3823.
- Ibeas, J., Lozano, J., Perdignes, F. and Jiménez, J. 1996. *Appl. Environ. Microbiology*, 62:998-1003.
- Jin, L.Z.; Marquar, R.R.; Zhoe, X. 2000. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterocoligenic *Escherichia Coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4200.
- Kristo, E.; Biliaderis, C.; Tzanetakis, N. 2003. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. *International Dairy Journal*. 13: 517 - 528.
- Mills, D.A. and Phister, T.G. 2003. *Appl. Environ. Microbiology* 69: 7430-7434.
- Miot-Sertier, C. and Lonvaud-Funel A. 2006. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 555-562.
- Mosson, P. 2001. Probiotics and prebiotics. *Pharm J.* 266: 118.
- Mulder R. 1996. Probiotics and competitive exclusion microflora against *Salmonella*. *World Poultry Special Salmonella*. May, P: 30-32.
- Neumann, E. 1998. Mono association with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germ free mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Dec. 3: 1565 - 1573.
- Newton, C.R. y A. Graham. 1994. PCR, Parte 1: Basic principles and methods. *EngBios Scientific Publishers*, Oxford, U.K.
- Nicholson, W.J.; Munakata, N.; Horneck, G.; Melosh, H.J.; Setlow, P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 64: 548 – 572.
- Nousian, E. 2000. Lactic acid bacteria as animal probiotics, En: *Lactic acid bacteria* (S.Salminen and von Wright, eds.), Marcel Decker, Inc. New York, Probiotics. P. 315 – 355.
- Oullivan, P. 2004. Probiotic bacteria: myth or reality? *Trends Food Sci Technol*: 3: 309 – 314.
- Ouwehand, A. C; Kirjavainen, P.V.; Short, C.; Salminen, S. 1999. Probiotics: mechanism and established effects. *International Dairy Journal* 9: 43-52.
- Pérez, M. 2000. Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Agraria de La Habana. Cuba.

- Piñad B.R.E. 2001. Evaluación de la actividad probiótica de un hidrolizado enzimático de crema de destilería en pollitas de reemplazo de ponedora. Tesis (en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias) — Ministerio de educación Superior. Cuba.
- Piloto, J.L.; Juncal, J.; Brizuela, M.; Serrano, P. 2000. Utilización del probiótico PROBLAC (*Lactobacillus rhamnosus*) en cerdos desde el nacimiento hasta el destete. I Convención Internacional de Porcicultura "PORCICULTURA 2000". La Habana. p. 49.
- Quiles A. y Hevia M. 2003. Características de la flora intestinal del lechón: efecto de los probióticos. Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. Ediciones Técnicas Reunidas. Producción animal.
- Ramírez, B.; Zambrano, O.; Ramírez, Y.; Rodríguez, Y.; Morales, Y. 2005. Evaluación del efecto probiótico del *Lactobacillus* spp. origen aviar en pollitas de inicio reemplazo de la ponedora comercial en los primeros 42 días de edad. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET 6 (9): 1-8.
- Roberfroid, M.B. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods. American Journal Clinical Nutrition 71: 1682.
- Röder, C. König, H. And Fröhlich, J. 2007. FEMS Yeast Res. 7: 1013-1026.
- Rosmini, M. R.; Sequeira G. J.; Guerrero-Legarreta, I.; Martí, L. E.; Dalla-Santina, R.; Frizzo, L.; Bonazza, J.C. 2004. Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. Revista Mexicana de Ingeniería Química 3:181-191.
- Sakata T, Kojima T, Fujieda M, Takahashi M, Michibata T. 2003. Influences of probiotic bacteria on organic acid production by pig caecal bacteria in vitro. Department of Basic Sciences, Ishinomaki Senshu University, Feb;62 (1):73-80; 986-8580 PMID: 12740061 [PubMed - indexed for MEDLINE].
- Salminen, S.; Laine, M.; von Wright, A.; Vuopio-Varkila, I.; Korhonen, T.; Mattila-Sandholm, T. 1996. Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: a Nordic and European approach. Bioscience Microflora 15: 61-70.
- Schierack P., Walk N., Reiter K. , Weyrauch K.D., y Lothar H. W. 2007 Composition of intestinal Enterobacteriaceae populations of healthy domestic pigs. Microbiology Journal Science.pág153. ISSN:3830-3837 DOI 10.1099/mic.0.2007/010173-0.
- Schrezenmeir, J.; D. Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. Animal Journal Clinical Nutrition 73: 361S.

- Stender, H., Kurtzman C., Hyldig- Nielsen J.J., D. Sorensen, A. Broome, K.Oliveira, H. Perry-O'Keefe, A. Sage, B. Young and J. Coull. 2001. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 938-941.
- Steward, S. 2002. The immunological activities of bacterial pepti-doglycans. *Ann Rev. Microbiol.* 34: 311– 340.
- Swientek, B. Beneficial Bacteria. Prebiotics and probiotics work in tandem to stimulate a healthy microflora in the gastrointestinal tract. *Food product development.* [en línea] noviembre 2003. Disponible en: http://www.preparedfood.com/archives/2003/2003_01/0101toc.htm [consultada: 18 septiembre 2009].
- Vandelle, M.; Teller, E.; Focant M. 1990. Probiotics in animal nutrition: a review. *Arch. Amm., Berlin* 40: 507-567.
- Yang, H.; Lopez, J.; Risley, C.; Radke, T. y Holzgraefe, D. 2003. Effect of adding a bacillus based direct fed microbial on performance of nurse piglets fed diets with or without antibiotics. *Journal of Animal Science* 2003. Supl 1: 41. Ref 165.
- Zhou, J.S.; Pillidge, C.J.; Gopal, P.K.; Gill, H.S. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology* 98: 211 – 217.