Aislamiento, selección y caracterización de una bacteria ácido láctica porcina como probiótico en lechones post destete

Angelo Rebolledo Londoño

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Palmira, Colombia

Aislamiento, selección y caracterización de una bacteria ácido láctica porcina como probiótico en lechones post destete.

Ángelo Rebolledo Londoño

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título:

Magister en Ciencias Agrarias

Directora:

SIRIWAN D. MARTENS.

Dr. Agr. Nutrición animal.

Codirectora:

PATRICIA I. SARRIA B.

Ph. D. Ciencias Agrarias.

Línea de Investigación:

Producción Animal Tropical

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Palmira, Colombia

Agradecimientos

La culminación de este trabajo fue un proceso que llegó a feliz término por la participación de personas que con su valioso aporte hicieron posible su realización, por tanto quiero agradecer de una manera muy especial a aquellos que de una manera u otra, aportaron a mi proceso de formación profesional y personal.

A Dios, mi abuela, mi madre, mi padre y mis hermanas por su paciencia y sacrificio durante esta etapa de mi vida, por su amor y apoyo que siempre me animó a continuar y salir adelante.

A mis tutores de trabajo de grado Dra. Siriwan Martens, investigadora en Nutrición Animal del CIAT y a la Dra. Patricia Isabel Sarria B., Profesora Asociada de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, por confiar en mí y concederme la oportunidad de trabajar con ellas, aprovechando su amplio conocimiento.

A los jurados por sus grandes aportes a la investigación.

A mis amigos y amigas que aportaron en la formación del documento.

Finalmente, agradezco a todos los integrantes de los Programas de Forrajes y de yuca y en general al personal del CIAT, y a la Universidad Nacional por su apoyo y colaboración para el desarrollo de esta investigación.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS
LINEA DE INVESTIGACIÓN PRODUCCIÓN ANIMAL TROPICAL

En Palmira a los 18 días del mes de Noviembre de 2014, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los Doctores JAIME EDUARDO MUÑOZ FLÓREZ y ARNOBIO LÓPEZ GALEANO.

Para calificar la Tesis de Grado de:

ANGELO REBOLLEDO LONDOÑO

Titulada:

"AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA BACTERIA ÁCIDO LÁCTICA PORCINA COMO PROBIÓTICO EN LECHONES POSDESTETE", bajo la dirección de las Doctoras Siriwan Martens y la Co-Dirección de Patricia Isabel Sarria.

Después de terminada la sustentación, el jurado evaluador compuesto por los investigadores JAIME EDUARDO MUÑOZ FLÓREZ y ARNOBIO LÓPEZ GALEANO, mediante deliberación privada decidieron calificar la Tesis como:

APROBADA X

REPROBADA ___

JAIME EDUARDO MUÑOZ FLÓREZ

ARNOBIO LÓPEZ GALEANO

Resumen

Con el objetivo de identificar y caracterizar bacterias acido lácticas BAL de origen porcino asociadas al estado de sanidad intestinal de los lechones posdestete, se llevó a cabo un experimento donde se aislaron 38 cepas de BAL para evaluar su potencial de colonización del tracto gastrointestinal a través de la prueba de *in vitro* de adhesión y aglutinación a mannosa. Se seleccionó la BAL L605 y se evaluó su capacidad para fermentar alimentos balanceados basados en maíz y soya, utilizados en lechones destetos a los 21 días de edad. A través de la metodología de Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR, se determinó que la cepa seleccionada pertenecía a la especie *Lactobacilus plantarum*. Posteriormente se utilizaron 18 lechones en la fase de lactancia, destete y post destete distribuidos en tres tratamientos (n=6) CT+: Tratamiento control positivo (con el antibiótico clortetraciclina clorhidrato); CT- : Tratamiento control negativo sin adición de BAL y sin antibiótico, y T Fermentado: Tratamiento fermentado con la adición de la BAL L605. Se observó diarrea en algunos animales del tratamiento CT+. Se tomaron muestras de alimento y materia fecal de los tres tratamientos a los 15, 22 y 26 ±1 días de edad. Las muestras de alimento y materia fecal fueron estandarizadas para detectar y cuantificar la especie *L. plantarum* por el método molecular de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Q-PCR). Con el fin de identificar de manera rápida la BAL L605 en cualquier muestra de interés, se utilizó la técnica de Amplificación del ADN Polimórfico al Azar (RAPD), por medio de la creación de *primers* específicos. Se logró aislar la BAL L605 con características probióticas y reproducirla para fermentar alimentos de lechones. A través de las técnicas moleculares fue posible detectar y cuantificar la BAL inoculada en el alimento y en las heces de los animales. La adición de un microorganismo como la BAL L605 con acción probiótico puede ser una opción para prevenir los problemas de salud intestinal a los lechones destetados precozmente.

Palabras claves*:* Probióticos, Bacterias Ácido Lácticas, Salud y Nutrición Animal, *Lactobacillus plantaru*, Lechones.

Abstract

In order to identify and characterize lactic acid bacteria (LAB) associated with porcine intestinal health status of piglets after weaning, an experiment was conducted where 38 LAB strains were isolated to assess their potential for colonization of the gastrointestinal tract through testing and adhesion to mannose in vitro. LAB L605 was selected and tested for its ability to ferment balanced meals based on corn and soybeans, used in piglets weaned at 21 days of age. By Polymerase Chain Reaction (PCR), we determined that the selected strain belongs to the species *Lactobacillus plantarum*. In the feeding experiment, 18 piglets were used in the phase of lactation, weaning and post-weaning divided into three treatments (n = 6) CT +: positive control treatment (with the antibiotic chlortetracycline hydrochloride); CT -: negative control treatment without added LAB and without antibiotic, and T Fermented: fermented with the addition of LAB L605 . Diarrhea was observed in some animals in the CT + treatment. Feed samples and feces of the piglets of the three treatments at 15, 22 and 26 ± 1 days of age were studied. Samples of food and feces were standardized to detect and quantify the species L. *plantarum* molecularly by real time quantitative Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR). To quickly identify the LAB L605 in any sample of interest, the technique of DNA amplification Random Polymorphic (RAPD) was used, through the creation of specific primers. using molecular techniques it was possible to detect and quantify the LAB inoculated in the feed and excreted in the feces of animals. The addition of a microorganism such as LAB L605 with probiotic activity may be an option to prevent intestinal health problems in early weaned piglets.

Keywords: Probiotics, Lactic Acid Bacteria, Animal Health and Nutrition, *Lactobacillus plantarum*, piglets.

Anexos

Anexo A. Preparación de medio de cultivo lactobacilli MRS Agar. 72
Anexo B. Preparación de medio de cultivo Difco Rogosa SL Broth Agar 73
Anexo C. Protocolo de prueba de adhesión a mannosa..... 75
Anexo D. Solución Ringer. 77
Anexo E. Protocolo de extracción de DNA de heces fecales..... 78
Anexo F. Protocolo de extracción de DNA de lactobacillus. 80
Anexo G. Geles de agarosa. 81
Anexo H. Protocolo pGEM® - Tand pGEM® - T Easy vector Systems..... 82
Anexo I. Programa PCR convencional. 86
Anexo J. Kit de extracción de ADN a partir de Geles de Agarosa y/o producto de PCR 87

Lista de tablas

Tabla 1 . Valores de pH a diferentes tiempos de muestras de alimento inoculado con la BAL L605 20
Tabla 2. Esquema de los tratamientos suministrados a lechones. 21
Tabla 3. Composición Química de las dietas ofrecidas a los lechones. 21
Tabla 4. Distribución de los lechones en cada uno de los tratamientos experimentales. 23
Tabla 5. Pareja de *primers* utilizados para amplificar la cepa L605 región 16S. 26
Tabla 6. Programa PCR. 27
Tabla 7. Programa Q-PCR. 30
Tabla 8. Prueba de adhesión y aglutinación a mannosa. 34
Tabla 9. Cuantificación de*Lactobacillus plantarum*(Log_{10} ng/µl)por Q- PCR en las dietas ofrecidos a los lechones 41
Tabla 10. Cuantificación por Q- PCR de *Lactobacillus plantarum* (Log_{10} ng/µl) de la materia fecal de los lechones en las diferentes dietas 42
Tabla 11. Cantidad del genero *Lactobacillus plantarum* región 16S (Log_{10} ng/µl) en la materia fecal por la técnica de Q-PCR 43
Tabla 12. Secuencias de *primers* diseñados a partir del aislamiento. 46
Tabla 13. Presencia o ausencia de diarreas a los 15, 22 y 26 ±1 días de edad de los lechones 49

Lista de figuras

Figura 1. Purificación de la Bacteria L605. 19
Figura 2. Microscopia electrónica prueba de adhesión y aglutinación de la bacteria L605 33
Figura 3. ADN total en la materia fecal 35
Figura 4. Amplificación pareja de primers con cepa L605. 36
Figura 5. .Amplificación de los productos de clonación Lpla-3 y PlanF 37
Figura 6. Verificación del ADN del plásmido. 38
Figura 7. Curva de Melting 39
Figura 8. Diluciones seriadas del plásmido 40
Figura 9. Regla de medición para la cuantificación de *Lactobacillus plantarum* 40
Figura 10. Especificidad aleatoria del pool de cepas usando la técnica de los RAPD's. 44
Figura 11. Amplificación de la extracción de ADN de la cepa L605 con los *primers* específicos 2, 3 y 9 45
Figura 12. Especificidad de los *primers* con respecto a la BAL L605 en alimento concentrado y materia fecal. 47
Figura 13. Amplificación de ADN de materia fecal con las parejas de *primers* diseñadas a partir de la secuencia de la cepa L605 48

Lista de Símbolos y Abreviaturas

Lista de Símbolos y Abreviaturas

Abreviaturas Termino

ADN……. Ácido Desoxirribonucleico.

APC……. Antibióticos Promotores de Crecimiento.

ARN……. Ácido Ribonucleico.

BAL……. Bacterias Acido Láctica.

bp ……. Pares de Bases.

CIAT……Centro Internacional de Agricultura Tropical.

dNTPs…….Nucleótidos Fosfatados.

FAO…….Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

GRAS…….Generalmente Reconocido como Seguro.

MS ……. Materia Seca.

NCBI…….Centro Nacional de Información sobre Biotecnología.

NTC……. Control con Agua.

OMS……. Organización Mundial de la Salud.

PCR……. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Q-PCR…….Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.

RAPD……Amplificación del ADN Polimórfico al Azar.

TGI……. Tracto Gastro Intestinal.

Unidad SI Definición
°C …….grados Celsius.
g ……..Gramos.
kg ……. Kilogramo.
L …….. Litros.
mA ……...Miliamperios.
min ……... Minutos.
mL …….Mililitros.
mM …….Milimolar.
ng ……. .Nanogramos.
nm ……. Nanómetros.
µl ……..microlitros.
UFC …….Unidad Formadora de Colonia.
rpm ……. Revoluciones por minuto.
v…...……. Voltios.

Tabla de contenido

Resumen I
Anexos III
Lista de tablas IV
Lista de figuras V
Lista de Símbolos y Abreviaturas VI
INTRODUCCIÓN 1
1 OBJETIVOS 3
2 MARCO TEÓRICO 4
2.1 Destete precoz de lechones 4
2.1.1 Alimentación de los lechones destetados precozmente 4
2.1.2 Dietas fermentadas de acción probiótica 5
2.2 Antibióticos 6
2.3 Probióticos 7
2.4 Bacterias ácido lácticas (BAL) 8
2.4.1 Clasificación de bacterias ácido lácticas 9
2.4.2 Propiedades bioquímicas de las bacterias ácido lácticas 9
2.4.3 Efecto de las BAL sobre la nutrición 11
2.4.4 Alimentos fermentados para lechones destetos 12
2.5 Técnicas de laboratorio para la evaluación del efecto probiótico de las BAL. 13
2.5.1 Prueba mannosa 13
2.6 Técnicas moleculares para la identificación y cuantificación de bacterias específicas 14
2.6.1 Extracción de ADN 15
2.6.1 Amplificación de los genes de interés 15
2.6.2 Reacción en cadena de polimerasa (PCR) 15
2.6.3 Electroforesis en gel 15
2.6.4 Bioinformática 16
2.6.5 Clonación 16
2.6.6 Estandarización 16
2.6.7 Q-PCR 17

2.6.8 RAPD 17
3 MATERIALES Y MÉTODOS 18
3.1.1 Localización y Condiciones del Muestreo 18
3.2 Aislamiento y Selección de BAL a partir de leche de cerda 18
3.2.1 Selección de la cepa a utilizar 19
3.2.2 Fermentación con la cepa 20
3.3 Animales 21
3.4 Prueba *in vivo* toma de muestras del alimento y materia fecal 22
3.5 Diseño experimental 23
3.5.1 Análisis estadístico 24
3.6 Siembra e caracterización microbiana de la materia fecal y alimento en medios de cultivo 24
3.7 Técnicas moleculares 25
3.7.1 Extracción de ADN 25
3.7.2 Análisis de secuencia 25
3.7.3 Amplificación de los genes 26
3.7.4 Clonación 27
3.7.5 Estandarización de curva de calibración Q-PCR 29
3.7.6 Q- PCR 29
3.7.7 RAPD 31
4 RESULTADOS 33
4.1 Aislamiento e identificación microbiológica de las BAL a partir de la leche de cerda 33
4.2 Extracción y amplificación de ADN 35
4.2.1 Amplificación por PCR 35
4.2.2 Estandarización y Cuantificación de BAL en heces de cerdo mediante Clonación y Q-PCR 36
4.2.3 QPCR 41
4.2.4 Diarreas 49
5 DISCUSIÓN 50
6 CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES 55
7 BIBLIOGRAFIA 57
8 ANEXOS. 72

INTRODUCCIÓN

Colombia cuenta con una población porcina cercana a los 3.938.587 animales, distribuidos en 197.305 predios distribuidos principalmente en los departamentos de Antioquia, Valle del Cauca y Cundinamarca (ACP, 2014). La alimentación de alto precio en la etapa después del destete es considerada la más delicada del ciclo de vida del cerdo por las dificultades de salud y pérdidas de productividad (Wallgren, 2001). La ausencia de la leche materna y el cambio repentino a un alimento sólido, baja la ingesta y causa disfunciones digestivas, diarrea, disminuye el crecimiento y con frecuencia ocasiona la muerte (Cromwell, 2002). Es por esta razón que se ha generalizado el suministro de antibióticos preventivos en los alimentos, sin embargo su uso exagerado en la producción porcina ha generado la aparición de cepas patógenas cada vez más resistentes (Oyetayo, 2005) con implicaciones negativas en la salud humana y animal. Se ha estudiado el uso de bacterias ácido lácticas (BAL), como opción a los antibióticos porque ayudan a disminuir las diarreas que afectan el equilibrio gástrico del animal. La inoculación de BAL en las dietas de los animales, regula las condiciones de pH y el comportamiento de los microorganismos en el tracto gastrointestinal, mejorando los parámetros productivos (Pérez, 2006; Oyetayo, 2005).

El uso de promotores de crecimiento naturales como las BAL, son capaces de modificar la microflora del organismo humano o animal y sustituir los microorganismos nocivos por microorganismos benéficos (Metchnikoff, 1907). Las BAL son una alternativa a los antibióticos, logrando que los sistemas de producción sean más rentables sin hacer necesario el uso de los anteriores aditivos (Antibióticos), que podrían suponer un riesgo para la salud del consumidor como también para el medio ambiente (Caja *et al.,* 2003).

Para las BAL su potencial de crecimiento y funcionalidad depende del medio en que se inoculen y las condiciones anaeróbicas que se les brinden para que ocurra el proceso de la fermentación (Vallejo, 1995). Una acción probiótica se

genera a partir de cultivos simples o mezclados de microorganismos vivos que aplicados a los animales o al hombre, benefician al hospedador mejorando las propiedades de la microflora intestinal (Havenaar, 1992). Las bacterias benéficas encapsulan las no benéficas causantes de diarreas y disfunciones como *Escherichia coli, Clostridium perfringens, Salmonella y Typhimurium (*Jurado y otros, 2009*)*. Algunas bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus plantarum* poseen propiedades de adhesión a las paredes del epitelio intestinal y la capacidad de multiplicarse en el lugar de fijación en el Tracto Gastrointestinal (TGI) (Briizuela, 2003).

1 OBJETIVOS

General:

Evaluar el aislamiento, selección y caracterización de una bacteria ácido láctica porcina como probiótico en lechones post destete.

Específicos:

- Aislar de la población microbiana presente en la leche de cerda una cepa bacteria con potencial ácido láctica para inocular en el alimento balanceado para lechones destetos a los 21 días.

- Caracterizar molecularmente la cepa bacteriana aislada de la leche de cerda e inocularla en el alimento balanceado y poder detectarla en la materia fecal de los lechones.

- Diseñar *primers* diagnóstico mediante la extracción de ADN de la cepa seleccionada que permita su detección en el alimento balanceado y en la materia fecal de los lechones.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Destete precoz de lechones

El lechón destetado a los 21 días o antes no dispone de un mecanismo eficaz para su termorregulación debido al poco espesor de su tejido adiposo subcutáneo, la delgado de su piel y la escasez de pelos (ITP, 1992). La capacidad de ingestión es muy limitada en los primeros días post-destete debido principalmente a la baja digestibilidad del alimento y déficit energético provoca frecuentemente pérdidas de peso (Tolplis, 1995) que puede corregirse mediante el manejo y el suministro de un alimento apetecible, rico en nutrientes asimilables y probióticos que reemplacen el uso de los antibióticos (Havenaar, 1992).

2.1.1 Alimentación de los lechones destetados precozmente

Se fabrican industrialmente alimentos con materias primas o subproductos de alta calidad que al ser mezcladas llenan los requerimientos nutricionales, de los lechones en reemplazo de la leche materna (Goodband, 1995). Cuanto mayor es la digestibilidad de los nutrientes en la dieta de destete, menos sustrato estará a disposición de los agentes patógenos en el intestino grueso; así mismo, la digestibilidad de los nutrientes en las dietas de destete se puede mejorar cambiando la forma física de la dieta, que puede ser granulada o líquida (James, 1984; Fuller, 1992).

La dieta líquida es una forma de suministrar a los lechones el alimento concentrado se derivan del maíz y soya en adicción de agua presentando una mejor aceptación debido a que el animal viene de suplir sus requerimientos a través de la leche materna, en forma líquida por lo tanto hay mejor aceptación del animal por la dieta solida (Choct *et al.,* 2004).

2.1.2 Dietas fermentadas de acción probiótica

La microbiota intestinal de los animales, está influenciada por la edad, la dieta, el uso de antibióticos y el estado de salud en que se encuentre el animal (Parkes *et al.,* 2009) en estudios previos, se ha demostrado que los probióticos previenen episodios de diarreas relacionadas con el consumo de materias primas que desequilibran la microflora intestinal en lechones post destete (*Maxwellaet al., 2004*; Figueroa, 2006). Ocasionando estrés y cambios en la inmunidad debido a la colonización por patógenos como *Escherichia coli, Clostridium perfringens, Salmonella spp* y rotavirus (Verdenelli *et al*., 2009).

La alimentación líquida (Deprez, 1987; Yang, 2001; Scholten, 2002) y fermentada puede beneficiar a los lechones mediante el aumento de altura de las vellosidades intestinales y la concentración de ácido láctico como producto de las bacterias (Van Winsen, 2001). Las BAL pueden disminuir el estrés del destete como también mejorar el valor nutritivo de los granos de cereales, debido al aumento de la actividad inherente de enzimas endógenas en los granos presentes en los alimentos balanceados (Choct, 2004).

La alimentación líquida con dietas fermentadas o con precursores de crecimiento, requiere la adición de un inóculo que permita ayudar a la fermentación (Briizuela, 2003); usualmente se prepara con una proporción determinada de agua más un acidificante como extracto de plantas o bacterias que añadidas a la dieta pueden mantener un pH entre 3,5 a 4,5 en el TGI (Wang *et al.,* 2004).

Los probióticos interactúan con la microbiota intestinal y con los receptores de la pared intestinal produciendo variedad de efectos benéficos en el hospedador (S. Salminen *et al.,* 2010).

2.2 Antibióticos

Los antibióticos son considerados sustancias químicas o naturales que adicionadas a la alimentación de animales domésticos causan un efecto de inhibición a microorganismos de acción patogénica, los cuales por lo general conllevan a la muerte de los animales además de ser los responsables en la inducción de alergias y resistencia de bacterias (Ocampo, 2007). Con frecuencia el término se usa erróneamente para referirse a organismos comensales con beneficios habituales en la salud o falsamente se limita a bacterias de origen humano (Foligné *et al.,* 2010); los efectos benéficos de los antibióticos deben demostrarse en animales y humanos (FAO y OMS, 2001; Azaïs-Braesco *et al.,* 2010).

En general, se acepta que los efectos benéficos de los antibióticos promotores de crecimiento son la consecuencia de la supresión de algunas bacterias patógenas en el tracto digestivo del animal, lo cual conlleva a una mayor utilización en la asimilación de los concentrados y a la estimulación de los procesos metabólicos debido al estado de inmadurez del animal (Cooper, 2008; Jones, 1984).

El uso de antibióticos promotores de crecimiento (APC) como aditivo antimicrobiano en el alimento, en concentraciones subterapéuticas, aumenta el rendimiento y la productividad de los animales, a través del control de bacterias patógenas inhibiendo crecimiento, manteniendo sano el tracto digestivo del animal y mejorando el aprovechamiento de los nutrientes contenidos en los alimentos; sin embargo, la preocupación de los consumidores sobre el posible traslado de la resistencia antibiótica a patógenos causantes de enfermedades humanas ha provocado la prohibición de la mayoría de los antibióticos promotores del crecimiento (Miles, 2002).

Freter en el año 1950, mostró un amplio panorama acerca de los antibióticos que destruían la microbiota intestinal de ratones haciéndolos vulnerables a patógenos como *Salmonella y Shigella* (Verdenelli *et al.,* 2009).

2.3 Probióticos

El término probiótico, derivado de bios, significa “por la vida”. Considerado un ingrediente funcional en el alimento (Jankovic *et al.,* 2010). Según la FAO, son microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrado en cantidades adecuadas, además de ser una opción de contrarrestar el uso de antibióticos.

Estudios previos en Japón entre los años 1940 y 1950 sobre la especie *Lactobacillus casei* y algunas especies de *Bifidobacterium* demostraron que estas bacterias son capaces de proteger a ratones jóvenes de infecciones intestinales asociadas a los efectos benéficos de las BAL. A partir del año 1960 se acuñó la palabra probiótico para designar las sustancias producidas por microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos (Lilly y Stillwell, 1965). Posteriormente, Fuller en el año1989, definió como un suplemento alimentario microbiano vivo que afecta de forma beneficiosa al animal huésped a través de la mejora de su balance microbiano intestinal. Gibson, 1999 realizó un cambio en el concepto, considerando que un probiótico es un microorganismo vivo que al ser ingerido en cantidades suficientes ejerce un efecto positivo en la salud más allá de los efectos nutricionales tradicionales (Fooks *et al.,* 1999; Ljungh y Wadström, 2009).

Algunos probióticos estimulan la producción de mucina en el TGI que compiten con las bacterias patógenas por adherirse modificando las toxinas derivadas por patógenos (Warren *et al.,* 2007); Los probióticos presentan un efecto benéfico en el tracto gastrointestinal del hospedero puesto que ejercen efectos

positivos en el sistema digestivo y tienen la capacidad de modular el sistema inmune contribuyendo al buen estado de la salud (Mattila- Sandholm *et al.,* 1999; Marteau *et al.,* 2002).

Las bacterias con acción probiótico, especialmente cepas de *Lactobacillus* tienen habilidad para influir en la colonización de pared intestinal (Fenell y Michetti 2003; Hamilton-Miller, 2003) inhibiendo las infecciones gástricas causadas por bacterias patógenas como es el caso de diarreas por ocurrencia de *Escherichia coli* (Dobrogsz, 1991) en animales y humanos a partir de metabolitos (Sgouras *et al.,* 2004; Wang *et al.,* 2004).

Como probióticos se establecen cepas pertenecientes a los géneros (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) aunque se emplean otros géneros como (*Enterococcus, Streptococcus y Saccharomyces)* (Idoui *et al.,* 2009). Las cepas probióticas pueden ser autóctonas o alóctonas (Quigley, 2010), cada una tiene características particulares y con diferente potencial benéfico para la salud animal (Warren *et al.,* 2007). La respuesta a la dosis suministrada aún no está claramente definida (Salminen *et al.,* 1999) pero se cree que es una alternativa al uso de antibióticos, mediante la inclusión de bacterias ácido lácticas con acción probiótico que permiten equilibrar la microbiota intestinal del animal.

2.4 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos que no forman esporas, son inmóviles, cocos o bacilos con bajo contenido de guanidina y citosina, que asociados por sus características metabólicas y fisiológicas comunes por ser Gram-positivas y facultativas constituyen un vasto conjunto de microorganismos benignos, dotados de propiedades similares, que fabrican ácido láctico como producto final del proceso de fermentación (Berrecal, 2002) se encuentran en grandes cantidades en la naturaleza, así como en el aparato

digestivo de los monogastricos. Aunque se les conoce sobre todo por su labor de fermentación de subproductos, las BAL incrementan el desempeño y la salud de los animales de interés zootécnico (aves, cerdos, bovinos) (Ramasamy *et al.,* 2010) promoviendo la salud del tracto gastrointestinal.

De acuerdo con varios investigadores, las BAL no solamente interviene en los mecanismos inmunológicos del tracto gastrointestinal, sino que también funcionan en la modulación y protección de la pared epitelial mejorando la absorción de los nutrientes (Foligné, 2010; Salminen, 1999; Ramasamy *et al.,* 2010). Las bacterias presentes en el intestino producen variedad de sustancias como ácidos grasos, peróxidos, bacteriocinas que pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas (Quigley, 2010).

2.4.1 Clasificación de bacterias ácido lácticas

El grupo de las BAL está formado por los siguientes géneros: (*Aerococcus, Alloiococcus, Carnobacterium, Dolosigranulum, Enterococcus, Globicatella, Lactobacillus, Lactococcus, Lactosphaera, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus y Weisella)*. Dicha clasificación corresponde a características similares entre ellas como morfológicas, metabólicas, fisiológicas, de crecimiento a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido, capacidad de crecer a elevadas concentraciones de sales y en la tolerancia ácido-base (Axelson, 1998).

2.4.2 Propiedades bioquímicas de las bacterias ácido lácticas

Las BAL acorde con los productos finales de la fermentación de carbohidratos solubles se dividen en homofermentativas L (+); heterofermentativas D (-) y facultativas. En el metabolismo homofermentativo, se produce predominantemente ácido láctico y las bacterias usan la hexosa. Algunas de

las bacterias que tienen este metabolismo presentan, en la fermentación heteroláctica una formación de xilulosa-5 fosfato por el sistema glucosa-6 fosfato deshidrogenado. Por lo anterior se puede decir que las heterofermentativas son más importantes que las homofermentativas (Jagnow, 1991) debido a rutas para producir ácido láctico.

Homofermentativas

Utilizan la ruta Emben Meyerhoff para convertir 1 mol de glucosa en dos moles de ácido acético (Almanza, 1991) además de producir más de 85% de ácido láctico de la glucosa.

Heterofermentativas

Estas bacterias producen cantidades equimolares es decir 1 mol de lactato, oxígeno y etanol a partir de glucosa usando hexosa monofosfato o la vía de las pentosa, generando la mitad de la energía del grupo homofermentativo (Jagnow, 1991)

Estas bacterias generalmente se encuentran en plantas y productos lácteos en descomposición produciendo ácido láctico como producto metabólico final de la fermentación de carbohidratos. Las BAL son fermentadoras de diferentes sustratos generándose una acidificación que produce la inhibición del crecimiento de agentes que causan descomposición, algunas BAL son productoras de bacteriocinas, las cuales son sustancias controladoras del crecimiento del microorganismo no benefico. La importancia de las BAL es por ser consideradas no peligrosas, debido a que están presentes en alimentos y su contribución como flora saprófita de las superficies mucosas humana y animal (Madigan, 2004).

La resistencia a la acidez gástrica, sales biliares y variables de pH son características importantes en la determinación de una BAL como inoculo en la producción animal, puesto que es necesario que lleguen vivos al final del intestino delgado y ciego para ejercer efectos inmunomodulador del epitelio intestinal (Ramasamy *et al.,* 2010).

La adherencia a la mucosa intestinal es una medida prioritaria a la cual debe someterse el microorganismo probiótico ya que la adhesión de microbiota competitiva, desarrolla la actividad microbiana que favorece el desplazamiento de patógenos permitiendo la colonización transitoria de la cepa (Kirjavainen *et al.,* 1998). Hay pocos estudios sobre las interacciones de probióticos en relación con las propiedades de adhesión en el intestino. La caracterización de los productos probióticos a nivel de género, especie y cepa es fundamental de un microorganismo inocuo y seguro denominado GRAS (Generally Regarded As Safe), en el estudio de sus efectos biológicos y clínicos (Azaïs-Braesco *et al.,* 2010). Sin embargo, se mencionan que esta mediada por la unión de proteínas de la superficie bacteriana como lecitinas a oligosacáridos del tejido presentes en la superficie. Permiten que la adhesión puede ser no específica debido a las interacciones hidrofóbicas con la superficie intestinal (Van den Abbeele *et al.,* 2009) otro mecanismo de adhesión para algunas especies de *Lactobacillus* es la vinculación a algunos glicoesfingolípidos específicos. Algunas cepas de *Bifidobacterium* poseen la enzima 1,2-a-L-fucosidasa implicada en la adhesión en el tracto intestinal (Yamamoto y Katayama, 2004).

2.4.3 Efecto de las BAL sobre la nutrición

Las bacterias ácido lácticas, son las responsables del proceso de fermentación láctica en la primera porción de tracto gastrointestinal, de esta forma se aumenta la disponibilidad de proteínas, aminoácidos y péptidos por su acción proteolítica la cual es limitada (Fooks *et al.,* 1999); debido a esta razón, la utilización de bacterias para aumentar la asimilación de los alimentos, que al ser consumidos por el hombre o animal no son muy aprovechables, como

pacientes intolerantes a la lactosa los cuales, corren el riesgo de disminuir los niveles de calcio y vitamina D existiendo predisposición a sufrir enfermedades como la osteoporosis, hace que las BAL sean una fuente confiable a la solución de intolerancia estimando que 65-75% de la población mundial tienen bajos niveles de lactasa (McCray, 2003). Las bacterias productoras de ácido acético y d-galactosidasa son capaces de aumentar la actividad de la lactasa, reduciendo los posibles problemas de asimilación (Fooks *et al.,* 1999; Vesa *et al.,* 2000).

Los lechones están expuestos a diario a millones de microorganismos patogenos, cuando consumen la cama, suelo o el estiércol de sus compañeros de camada (Vesa *et al*., 2000). Bacterias, tales como la *Escherichia coli, Clostridium y Salmonella* son patógenas, causales de enfermedades cuando se consumen debido a que viajan a través del tracto digestivo infectando las células epiteliales del intestino del hospedero (Ferket, 2002).

2.4.4 Alimentos fermentados para lechones destetos

La fermentación de los alimentos mediante la inoculación de las BAL disminuye los valores del pH la presencia de azúcares simples (glucosa y frutosa) y de pH ácido, dará lugar a una fermentación por bacterias lácticas que modificarán el ambiente, impidiendo el crecimiento de otros microorganismos, a pH bajos debido a la formación de lactato a partir de azúcares, protegiendo del deterioro causado por otros tipos de bacterias (Canibe, 2012).

Las moléculas (almidón y glucógeno) no son directamente fermentables; pero pueden hacerse fermentables mediante la adición de enzimas sacarolíticas de otros orígenes como las producidas por la germinación de la cebada durante la producción de la cerveza o las producidas por hongos como *Aspergillus* (Almenza, 1991).

2.5 Técnicas de laboratorio para la evaluación del efecto probiótico de las BAL

Un diagnóstico microbiológico es el conjunto de procedimientos y técnicas complementarias empleadas para establecer la etiología del agente responsable de una enfermedad infecciosa y poder así proceder a su tratamiento, en caso de que fuera necesario las medidas correspondientes para evitar la diseminación del patógeno, es decir, son específicas para la cuantificación y detección de la BAL (Pieper, 2009).

Para la identificación es imprescindible la labor del laboratorio, que aporta datos preliminares o definitivos sobre los agentes patológicos causantes de la afección; para ello se lleva un procedimiento ordenado que comprende: toma de muestras (esputo, sangre, heces, tejidos) que dependerán de la sospecha de procedencia de la afección, observación al microscopio si procede, obtención de colonias aisladas, cultivo, Identificación del género y de la especie mediante test bioquímicos, genéticos, inmunológicos test de sensibilidad a los antibióticos (punto de corte, antibiograma, MIC) (Madigan, 2004)

2.5.1 Prueba mannosa

La utilización de pruebas microbiológicas como la adhesión y aglutinación a mannosa (Pretzer *et al.,* 2010) es un método que permite *in vitro* simular el comportamiento de las bacterias ácido lácticas en el trato gastrointestinal del animal. La aglutinación es un indicador de comportamiento de las bacterias ácido lácticas en forma y calidad de colonizar las paredes intestinales y aumentar el tamaño de microvellosidades (Beuvier *et al.,* 1997).

La prueba de adhesión y aglutinación a mannosa es útil para determinar de manera *in vitro,* el comportamiento mediante la mayor cantidad de aglutinación

y adherencia a las paredes del TGI del cerdo (Pretzer *et al.,* 2010) para que posteriormente sea inoculada en campo, es decir, simulando las condiciones de vida de las bacterias en el TGI.

Las pruebas *in vitro* son pruebas piloto las cuales encierra todo el conjunto de fenómenos observados en el laboratorio, a partir de productos biológicos vivos para mantener organismos vivos (células, espermatozoides, óvulos, virus, Bacterias, Hongos, etc.). En condiciones diferentes a las naturales, con técnicas de laboratorio para luego ser aplicadas en campo (Fernández, 1997).

2.6 Técnicas moleculares para la identificación y cuantificación de bacterias específicas

Desde la década de 1950 y 1960, los biólogos moleculares se caracterizan por, aislar y manipular los componentes moleculares de las células y organismos. Estos componentes incluyen el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el repositorio de información genética ácido ribonucleico (ARN) (Judson, 1979). Para realizar este proceso se inicia con la extracción de ADN, visualización del ADN en un gel de agarosa para determinar el estado en que se encuentra, selección de los *primers* para realizar amplificación de la región conservada 16s que permita la cuantificación del microorganismo que se inoculo por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Q-PCR), por ultimo a partir de la secuencia de la cepa inoculada generar por medio bioinformática el diseño de *primers* específicos haciendo uso de la técnica de amplificación del ADN polimórfico al azar (RAPD) o que permitan con estos *primers* específicos la rápida detección de presencia o ausencia de la bacteria inoculada como un test diagnóstico (Williams, 1990).

2.6.1 Extracción de ADN

La búsqueda de un eficiente método de extracción significa más ADN de mayor calidad y rendimiento. Esto ha llevado al desarrollo de una variedad de protocolos, sin embargo los fundamentos de extracción de ADN siguen siendo los mismos. El ADN debe ser purificado de material celular de una manera que impida la degradación (NCBI, 2014).

2.6.1 Amplificación de los genes de interés

Un gen es una unidad de información dentro del genoma que contiene todos los elementos necesarios para su expresión de manera regulada. Se aprovecha esta característica para transferir genes de un organismo a otro y expresarlos (producir las proteínas para las cuales estos genes codifican) en organismos diferentes al de origen. Al obtener el nuevo ADN con la ayuda de técnicas moleculares se verifica si el gen de interés se expresa o no (NCBI, 2014 a).

2.6.2 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de polimerasa es una técnica muy versátil para la copia de ADN. En breve, PCR permite una sola secuencia de ADN que se copien millones de veces (NCBI, 2014 b).

2.6.3 Electroforesis en gel

Electroforesis en gel es una de las principales herramientas de la biología molecular. El principio básico es que el ADN, ARN y proteínas pueden ser

separados por medio de un campo eléctrico (NCBI, 2014 c), se separan por su tamaño midiéndose por un marcador molecular en pares de bases.

2.6.4 Bioinformática

Es un área de la biología que se ocupa del desarrollo de técnicas para la recogida y manipulación de los datos biológicos; el uso de estos datos para hacer descubrimientos biológicos o predicciones. Este campo comprende todos los métodos y teorías aplicables a la biología molecular para resolver problemas biológicos, incluyendo la manipulación de modelos y conjuntos de datos computacionales (NCBI, 2014 d).

2.6.5 Clonación

La clonación es un proceso molecular el cual consta de obtener muchas copias de un fragmento de interés lo más puro que se pueda (Kleerebezem, 1997).

En esta técnica, el ADN de codificación para una proteína de interés, se clona mediante PCR y enzimas de restricción en un plásmido conocido como un vector de clonación. Este plásmido puede tener vectores de expresión a la producción de la unidad de la proteína de interés y también puede tener marcadores de resistencia a los antibióticos para ayudar a seguir el plásmido. (NCBI, 2014 e).

2.6.6 Estandarización

La estandarización consiste en ajustar o adaptar variables en la investigación, sea de parte de los protocolos utilizados o las colectas de muestras siempre y cuando se cumpla con los objetivos propuestos de la mejor manera (NCBI, 2014 f).

2.6.7 Q-PCR

La PCR cuantitativa (q*uantitative* p*olymerase* c*hain* r*eaction*; qPCR o Q-PCR) o PCR en tiempo real (*real time PCR*; RT-qPCR o RT-Q-PCR) es una variante de la PCR utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN, Para ello emplea el mismo modo que la PCR convencional, un molde de ADN, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado y un ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo, que en un termociclador albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos de la bacteria (Watson, 2004). Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por esto que también se le denomina PCR en tiempo real.

2.6.8 RAPD

(Random Amplified Polymorphic DNA): Es un método simple de senotipificación basado en ácidos nucleicos. Consiste en la detección de diferencias en la secuencia del ADN genómico total de distintas cepas (Williams, 1990), amplifica regiones de ADN al azar encabezadas por secuencias a las que son capaces de unirse iniciadores de secuencia única aleatoria. La secuencia del iniciador no tiene homología conocida con el ADN diana, genera fragmentos de distintos tamaños que pueden apreciarse en gel de agarosa. No es necesario conocer previamente la secuencia de la muestra, se puede emplear con variedad de especies y es más rápido que otros métodos de tipado. Esta metodología indicara si existe una banda específica, de la bacteria inoculada en la alimentación, la cual nos permitirá determinar presencia o ausencia de bacterias a lo largo del tiempo (Song, 2000); si existe la banda se realiza la clonación del fragmento de interés obtenido.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1 Localización y Condiciones del Muestreo

La investigación se llevó a cabo en Granjas Paraíso, un sistema intensivo de producción de cerdos, ubicado en el Valle del Cauca, municipio de Palmira, 3°31´48" de latitud Norte y 76°81´13" del longitud al Oeste de Greenwich. La temperatura promedio es de 23 °C y su altura sobre el nivel del mar es de 1.001 metros; y en los laboratorios del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), ubicado en la recta Cali - Palmira3°30′17″ de latitud Norte y 76°21′24″de longitud al Oeste de Greenwich con condiciones medioambientales similares a las del sitio experimental granja paraíso.

3.2 Aislamiento y Selección de BAL a partir de leche de cerda

Para seleccionar la cepa BAL a usar como inoculo para la fermentación de la dieta para los lechones se colectó leche de tres cerdas del laboratorio agropecuario Mario González Aranda de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Antes del ordeño se limpió y desinfecto la zona de la glándula mamaria de cada animal.

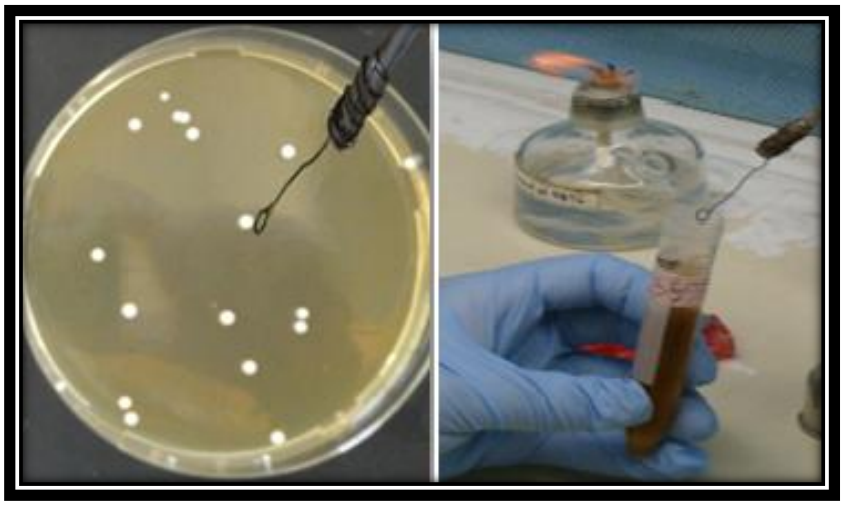
Las muestras de leche se colectaron en tubos de centrifuga de 15 ml después de extraer la leche de cada una de las cerdas (Walstra, 2001) las cuales ya había finalizado la producción del calostro.

Cada muestra colectada de leche de cerda, se tomó una alícuota y se sembró, en agar *Lactobacilli* MRS (Lactobacilli M.R.S BROTH, Acumedia Ref# 7406B Lote# 106129A Neogen Corporation) (DeMan, 1960) específico para bacterias ácido lácticas (**Anexo A.**) y Agar Difco Rogosa (Difco™ Rogosa SL BROTH Becton Dickinson (BD) Ref# 247810 Lote# 8113244 BD Company U.S.A) SL (Medio de cultivo para *lactobacilos* orales, vaginales y fecales, (Rogosa et al., 1951) (**Anexo B.**) Estas siembras se realizaron en cajas Petri colocando

alrededor de 20 µl de leche distendidos con un asa y luego fueron llevadas a una incubadora a 37˚C por 72 horas (MRS) ó 120 horas (Rogosa) (Tournut, 1994).

Posteriormente las cajas Petri fueron llevadas a la cabina de flujo laminar (Labconco Purifier 8811 Prospect K.C., MO Ref# 64132 Serial# 36055-02 Labconco Corporation Kansas City, Missouri) donde se escogió la bacteria que estuviese más definida y distante de las demás, asumiendo que fuera pura. Se tomó con una asa estéril y se inoculó en tubos de centrifuga de 15 ml con un volumen de 10 ml del medio MRS líquido y posteriormente fueron llevados a la incubadora (Napco 320 Serial# 7-31-1593-4 national Appliance. Co A Heinicke Company U.S.A) a 37˚C por 24 horas y almacenadas a 4 ˚C para luego ser analizadas. (**Figura 1**)

Figura 1. Purificación de la Bacteria L605.



3.2.1 Selección de la cepa a utilizar

Se obtuvieron 38 aislamientos de bacterias ácido lácticas para realizar la prueba de adhesión-aglutinación a mannosa y seleccionar las cepas promisorias para fermentar el alimento de los lechones. La metodología utilizada fue el protocolo de prueba de fermentación *in vitro* (Rostock

fermentation test) en el cual permite determinar valores de pH con respecto al tiempo. Esto permitió una evaluación de la capacidad fermentadora de BAL la prueba se modificó (Pieper, 2009). Se realizó una prueba de adhesión y aglutinación a mannosa (Pretzer *et al.,* 2010) (**Anexo C**), para identificar las cepas evaluadas con mayor aglutinación y por ende una mayor fijación a las paredes del TGI, cuando se presenta una alta incidencia de aglutinación por parte de las BAL, aumenta la fijación de ellas a las paredes del TGI lográndose un tapizamiento de las paredes intestinales las cuales causan un efecto benéfico controlando el crecimiento de bacterias no benéficas.

3.2.2 Fermentación con la cepa

Se seleccionó la cepa L605 para utilizarla como inóculo del alimento de los lechones. Se determinó el tiempo de fermentación adecuado para obtener un pH optimo en la fermentación de la dieta con la adición de la BAL L605 verificando el pH con un pHmetro (Mettler-Toledo GmbH: MP120 pH metro, Schwerzenbach, Suiza) (**Tabla 1**) para determinar el grado de acidificación de la BAL L605 en condiciones de campo, el descenso del pH con relación a la fermentación permite lograr el crecimiento rápido de la BAL inoculada mediante la anaerobiosis (sin presencia de oxigeno) producción de pepsina la cual mejora la absorción de la proteína generando una respuesta positiva para las condiciones medio ambientales (Rudbäck, 2013).

Tabla 1 . Valores de pH a diferentes tiempos de muestras de alimento inoculado con la BAL L605

	Lecturas de pH (Horas)			
	0	**24**	**48**	**72**
Promedios	5.9 ± 0.2	4.6 ± 0.5	4.3 ± 0.5	4.0 ± 0.4

3.3 Animales

Los lechones fueron distribuidos en 3 grupos experimentales (**Tabla 2**) los cuales a medida que fueron creciendo (edad en días) se ajustaron las cantidades de concentrado y del inoculo de la cepa L605 respectivamente para todos los grupos, las dietas utilizadas en la investigación (

Tabla 3**)**

Tabla 2. Esquema de los tratamientos suministrados a lechones.

Grupo	Tratamiento	Antibiótico comercial	Dieta líquida + L605	%MS
1	Control +	Con	Sin	92.23
2	Control -	Sin	Sin	91.22
3	Fermentado	Sin	Con	23.25

Tabla 3. Composición Química de las dietas ofrecidas a los lechones.

	Dieta 21% PC + antibiótico	*Dieta 18% PC sin antibiótico
Maíz amarillo precocido	44.5	48.2
Torta de soya 44 % PC	6.0	4.0
Grano de soya extruido	4.0	5.0
Lactosa 80%	17.5	17.5
Harina de pescado 61%	6.0	6.0
Hemoglobina	10.5	7.0
Aceite de soya	2.3	3.0
Panela en polvo	6.0	6.0
L-lisina HCL 78%	0.00	0.35
D-L metionina 99%	0.14	0.20
L-treonina	0.00	0.10
Carbonato de Calcio	1.2	0.8
Tricalfos	0.02	0.08
Sal yodada	0.35	0.4
Fosfato bicalcico	1.12	1.10
Vitamininas y minerales	0.10	0.10
Luctaroma	0.20	0.20

*Corresponde a la dieta fermentada, solo que se adicionaron partes de agua

Los animales recibieron los tratamientos experimentales entre los días 10 y 35 de vida. Se tomaron muestras de las dietas, para realizarles análisis del contenido de materia seca (% MS); con el cual se estandarizó la cantidad de adición del inoculo a lo largo del ensayo, en proporciones de 1 ml de inoculo de la cepa L605 con una concentración de 10^{12} unidades formadoras de colonia (U.F.C), por cada Kg de alimento balanceado se adiciono 1 litro agua para facilitar la fermentación y disminuir el % MS.

De cada grupo experimental se escogieron 6 animales al azar los cuales se muestrearon, mediante la colecta de materia fecal, los días 15, 22 y 26 (± 1 día) de edad. Estas muestras se colectaron en tubos de microcentrifuga 2,0 ml y de 15 ml respectivamente previamente autoclavados y rotulados para posteriormente llevarlos a los laboratorios del CIAT donde se desarrollaron las pruebas moleculares.

3.4 Prueba *in vivo* toma de muestras del alimento y materia fecal

Durante el periodo experimental se colectaron cuatro muestras de las dietas ofertadas a los lechones como también una muestras de materia fecal de los animales muestreados a los 15, 22 y 26 ± 1 días de edad, se seleccionó seis lechones que estaban consumiendo cada una de las tres dietas o tratamientos, para un total de 18 animales. Las muestras de materia fecal fueron tomadas a los 15, 22 y 26 ± 1 días de edad **(**

Tabla 4). Previo a la colecta se realizó una desinfección de la región perianal. Las muestras se depositaron en tubos de microcentrifuga 2ml previamente autoclavados y rotulados con el número del lechón, fecha de la toma de muestra y tratamiento correspondiente, por último se almacenaron a 4°C, para previos estudios.

Tabla 4. Distribución de los lechones en cada uno de los tratamientos experimentales.

Muestreo de lechones a los 15, 22 y 26 días de edad	
Numero de lechón	**tratamiento**
3	Control +
1	Control +
13	Control +
10	Control +
23	Control +
6	Control +
7	Control -
12	Control-
20	Control -
2	Control -
4	Control -
8	Control -
22	Fermentado
28	Fermentado
37	Fermentado
9	Fermentado
5	Fermentado
21	Fermentado

3.5 Diseño experimental

Para este trabajo de investigación se utilizó un diseño de bloques completos al azar donde el criterio de bloqueo fue la edad inicial de los lechones de cada tratamiento con seis repeticiones para un total de dieciocho animales o unidades experimentales la variable a analizar fue la cantidad de ng/µl de *Lactobacillus plantarum* y la cantidad U.F.C de BAL inoculada en la dieta fermentada.

3.5.1 Análisis estadístico

Se utilizó el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS 9.2 para Linux (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE.UU.) con el fin de determinar si existieron diferencias estadísticas en la cantidad de *Lactobacillus plantarum* de las muestras de las dietas y la materia fecal de los lechones en los tres tratamientos.

3.6 Siembra e caracterización microbiana de la materia fecal y alimento en medios de cultivo

Al obtener las muestras colectadas de materia fecal se procedió a identificar de manera visual que animales de los tratamientos muestreados presentaban presencia o ausencia de diarrea. Posteriormente se tomaron ± 230 mg de las muestras de materia fecal de cada uno fueron suspendidas en una solución tampón Ringer (**Anexo** D), se tomó una alícuota de 100 µl y se extendió con un rastrillo de vidrio en cajas Petri que contenían medios de cultivo específicos para *Lactobacillus* MRS y Rogosa siguiendo los protocolos descritos anteriormente.

Pasado el tiempo de incubación, cada una de las cajas Petri fue llevada a la cabina de flujo laminar, el contenido de la caja petri se lavó con un volumen de 1000 µl de solución Ringer, con la ayuda del rastrillo de vidrio previamente esterilizado con alcohol al 96% de pureza, cada alícuota obtenida se depositó en un tubo para microcentrifuga de 1.5 ml autoclavado y rotulado no se centrifugaron, los resuspendidos bacterial de la caja Petri fueron almacenados 4°C, se tomó una alícuota de 100 µl de cada una de las muestra para criopreservación en glicerol al 70% a una temperatura de -80°C.

3.7 Técnicas moleculares

Estas técnicas fueron utilizadas para determinar a qué especie pertenece la cepa, cuantificarla y diseñar *Primers* específicos para la detección de la BAL L605 en el alimento y heces.

3.7.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN total de materia fecal de lechones, se realizó con un kit de extracción de ADN en heces fecales (QIA amp® DNA Stool Mini Kit (50) Ref# 51504 Lote# 142331113, 03/2011 QIAGEN Corporation) (**Anexo E**).

Además se realizó la extracción de ADN del cultivo de bacterias acido lácticas mediante el kit de extracción de ADN de *Lactobacillus* (wizard® Genomic DNA Purification Kit Ref# A1120 Lote# 0000000552, 08/2013 Promega Corporation) (**Anexo F**).

3.7.2 Análisis de secuencia

Mediante una búsqueda bibliográfica se analizaron los genes conservados de *Lactobacillus.* En las secuencias reportadas en el Gen bank o (NCBI, 2014) se realizó un lineamiento de las secuencias obtenidas a través del NCBI mediante el programa CLUSTALW (Genoma, 2014). Se emplearon secuencias de cebadores (*Primers*) reportadas como punto de partida, permitiendo identificar la similaridad entre secuencias del genoma completo de *Lactobacillus plantarum* con la base de datos.

3.7.3 Amplificación de los genes

Esta amplificación se realizó utilizando el ADN total extraído de las muestras de materia fecal y de los tratamientos, con diferentes parejas de cebadores (Song, 2000) **(Tabla 5.)**

Tabla 5. Pareja de *primers* utilizados para amplificar la cepa L605 región 16S.

Secuencia Nombre	Secuencia (5' - 3')	Annealing temp °C	Especie	Autor
ParaF	F- GTCACAGGCATTACGAAAAC	60	*L. paraplantarum*	Torriani et al. 2001
	R- TCGGGATTACCAAACATCAC			
Lpla-3	F- ATTCATAGTCTAGTTGGAGGT	60	*L. plantarum*	Song et al. 2000
	R- CCTGAACTGAGAGAATTTGA			
PlanF	F- CCGTTTATGCGGAACACCTA	60	*L. plantarum*	Torriani et al. 2001
	R- TCGGGATTACCAAACATCAC			
PentF	F- CAGTGGCGCGGTTGATATC	60	*L. pentosus*	Torriani et al. 2001
	R- TCGGGATTACCAAACATCAC			
PeC	F- CTGTTTTCAATGTTGCAAGTC	60	*L. helveticus*	Fortina et al. 2001
	R- TTTGCCAGCATTAACAAGTCT			
PeN	F- CGCTGATTCTAAGTCAAGGCT	60	*L. helveticus*	Fortina et al. 2001
	R- CGACTAAGAAGTGGAACATTA			

Siguiendo las condiciones de amplificación de la técnica molecular de PCR convencional (Taq® recombinante (5 Unidades de Taq DNA Polymerase, recombinante, Invitrogen, Part# 10342, MAN0000814, 05/2010)). buffer10 X , dNTP's 10 Mm,Mg^{2+}50 Mm Primer fwd -rv 10 pmol/ µl, Taq® Recombinante (Invitrogene) 5 U/ µl y ADN 2 ng/µl, con un volumen final de 12 µl en un termociclador (PTC-100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc., Waltham

02451, MA, USA) con el programa descrito en la (**Tabla 6**).Esta metodología adaptada de (Han, 2011) con algunos cambios establecidos en el laboratorio de patología de forrajes del CIAT. La visualización del ADN se realizó en un gel de agarosa 1.5 %(**Anexo G**) el cual se tiño con SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen S33102, USA.) tinte altamente sensible para la visualización de ADN en geles de agarosa a 140 v por 1.5 horas en un buffer 0.5x de TBE, para estimar el tamaño de los productos amplificados se empleó un patrón de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Promega Ref# 10787-018, USA.) con un rango de lectura entre 12000 y 100 pb.

Tabla 6. Programa PCR.

Programa PCR convencional		
Paso 1	Desnaturalización inicial 95°Cx10 min	1
Paso 2	Desnaturalización 95°C x 1 min Hibridación 55°C x 0.30 seg Extensión 72°C x 0.45 seg	40 ciclos
paso 3	Extensión final 72°C x 10 min	1
	Hold at 4°C	1

3.7.4 Clonación

La clonación se realizó mediante el criterio de bandas especificas del microorganismo *Lactobacillus plantarum* L605 tanto para la técnica de Q-PCR como de RAPD se llevó a cabo, usando como vector de transferencia, el plásmido comercial pGEM-T easy® (pGEM-T easy® Vector Promega Ref# A1360 Lote# 0000048514 U.S.A) (**Anexo H**). La posterior transformación se hizo mediante choque térmico de tener las muestras en hielo y posteriormente llevarlas a 37°C por treinta segundos, usando como hospedero, la bacteria *E. coli* (cepa DH5α).La selección de las colonias transformantes se realizó a través de medio de cultivo LB BROTH (Difco™ LB Broth Becton Dickinson (BD) Ref#240230, Lote# 3036444. BD Company U.S.A) el cual contenía ampicilina y X-gal. Encontrando colonias de dos tipos en el master plate de colores color azul donde son colonias que no contiene el fragmento o inserto de interés o lo tienen parcialmente debido a que la enzima X-gal no se sgmento con el transformante, caso contrario a las colonias de color crema cuyo proceso bioquímico de inserción del fragmento de interés se completó. Los transformantes colonias de color crema se sembraran en medio líquido LB se incubaran a 37 °C durante toda la noche y fueron utilizados para la extracción de ADN del plásmido contenido en la bacteria. Esto se envió para ser analizado y secuenciado a Macrogen Korea (Macrogen, 2013) usando los cebadores universales T7 y SP6.(SP6 Promoter primer Ref Q501, T7 Promoter primer Ref Q502 Promega Corporation U.S.A).Se realizó la visualización de los productos de la clonación en un gel de agarosa 1.5% (**Anexo G)**.

Para tener de manera pura el fragmento de interés con el inserto, fue sometido el fragmento clonado a una nueva PCR convencional para determinar que si presenta el número de pares de bases que reporta la literatura dependiendo de la especie que se estudió, de tal manera que al ratificar que cumplió con todos los parámetros anteriormente nombrados y se cuantificó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop 2000/ 2000c Spectrophotometer, Wilmington, Delaware USA.).

De cada una de las parejas de los *primers* se escogieron tres clones (uno para crio preservar y los otros para trabajar en una curva estándar) se visualizó en un gel de agarosa (**Anexo G**)

3.7.5 Estandarización de curva de calibración Q-PCR

Para la estandarización de la curva se procedió a partir de los productos de la clonación de los fragmentos amplificados para *Lactobacillus plantarum* fue necesario la corrida de 3 platos de 96 pozos los cuales contenian la curva diseñada y las muestras de materia fecal de los animales en las diferentes edades. Cada uno de los platos presenta la curva estandar patron, cuyos valores son estables entre los diferentes eventos de medicion, dieta fermentada la cual posee el inoculo de la BAL L605 (Han, 2011; Song, 2000).

Se realizaron diluciones seriales del fragmento clonado el cual permitió la construcción de la regla de medición (Han, 2011), referente acerca de la cantidad de ng/µl de *Lactobacillus plantarum* que fueron encontrados en las dietas ofrecidas y la materia fecal de los animales muestreados.

3.7.6 Q- PCR

Se utilizó la metodología de Q-PCR (Polymerase chain reaction-real time) siguiendo las condiciones de amplificación Brilliant II SyBR® Green QPCR Master Mix 2 X,Primer fwd – rv 10 pmol/ µl y ADN 2 ng/ µl un volumen final de 50 µl para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto del ADN con relación, a las especificidad de los primers de las secuencias candidatas conservadas para *Lactobacillus plantarum* (Tamminen, 2012).

La cuantificación de la PCR en tiempo real se determinó mediante el uso de (Mastercycler realplex^4 Eppendorf. AG 22331 Ref# 6302 Lote# Z239043L.

Hamburg) y el reactivo de master mix I (Brilliant II SyBR® Green Master Mix Ref# 600828, Lote# 0006193380 agilent Technologies. U.S.A) para la cuantificación de los *Lactobacillus plantarum* que se presentaron en las diferentes muestras tanto de materia fecal como del alimento balanceado, haciendo uso del primer Lpla-3 (**Tabla 5**). Los reactivos utilizados fueron 10 µl de Sybr Green I (Brilliant II SyBR® Green Master Mix Ref# 600828, Lote# 0006193380 agilent Technologies. U.S.A) master, primer 2 µl y ADN 5 µl completando el volumen con agua para PCR, el volumen final de reacción de 20 µl. Para esta técnica se utilizó el programa (**Tabla 7**)

Tabla 7. Programa Q-PCR.

Programa Q-PCR			
Paso 1	Desnaturalización		
	ion inicial 95°C	x 10 min	
			40 ciclos
Paso 2	Desnaturalización		
	95°C	x 1 min	
	Hibridación 55°C	x 0.30 seg	
	Extension 72°C	x 0.45 seg	
paso 3	Extension final		
	72°C	x 10 min	
	Hold at 4°C		
Stage 4 Curva de	Denaturalización		
Melting	inicial 95°C		
		x 1 min	
	Hibridación 55°C	x 0.30 seg	
	Extension ↑	20:00 min	

	Extension final	x 0.30 seg
	95°C	

3.7.7 RAPD

Se utilizó la metodología de RAPD (Amplificación del ADN Polimórfico al Azar) siguiendo las condiciones de amplificación Taq® Recombinante (Taq® recombinante (5 Unidades de Taq DNA Polymerase, recombinante, Invitrogen, Part# 10342, MAN0000814, 05/2010)) buffer 10 X, dNTP's10 Mm, Mg^{2+}50Mm, Primer 10 pmol/ µl Taq® Recombinante (Invitrogene) 5 U/ µl.

La detección de la bacteria ácido láctica promisoria utilizada como inoculo se amplificó probando nueve primers de 10 decameros (Operon Technologies INC) a través del equipo (Mastercycler Pro Vapo Protect Eppendorf. AG 6321 Ref# 6321 Lote# ZL404536. Hamburg) para determinar patrones polimórficos que permitieron identificar una banda o bandas específicas de la cepa L605, con respecto a las cuatro cepas que también fueron promisorias para ser utilizadas como inoculo pero que no se incluyeron en esta investigación.

Se tomaron muestras del pool de cepas promisorias y de la cepa de interés L605, y se corrieron con 9 primers distintos: primer 1 OPN-05 (Operon Technologies INC).Primer 2 OPK-04 (Operon Technologies INC).Primer 3 OPK-17 (Operon Technologies INC). Primer 4 OPJ-10 (Operon Technologies INC).Primer 5 OPK-03 (Operon Technologies INC).Primer 6 OPK-11 (Operon Technologies INC).Primer 7 OPK-01(Operon Technologies INC). Prime8 OPZ-04 (Operon Technologies INC) y primer9 OPK-08 (Operon Technologies INC).Para la visualización de los productos de clonación en geles de agarosa 1.5 %(**Anexo G**).

La banda encontrada en el gel anteriormente nombrado la cual pertenece a la BAL L605 con algunos de los 9 primers específicos a la cepa que fue reproducible, debido a que presento un patrón de bandeo diferente en comparación de las otras cepas promisorias. Entre los diferentes *primers* utilizados se extrajo el ADN a partir del gel (**Anexo J**) y se envió a Macrogen, para ser secuenciada, una vez obtenida esta secuencia, se diseñaran pares de *primers* específicos a la cepa, esto permitió la rápida identificación de la cepa L605 *Lactobacillus plantarum* en el alimento concentrado inoculado y la materia fecal de los lechones.

Para la visualización de los productos RAPD en geles de agarosa 1.5 % (**Anexo G**).

Se realizó una PCR convencional con las extracciones de ADN de los alimentos concentrados ofertados como dietas con y sin inclusión de la BAL L605 y otra bacteria ácido láctica *Lactobacillus plantarum* que no fue utilizada en esta investigación llamada Biosil (un probiótico comercial).

También se tomó una muestra de materia fecal, para determinar la especificidad de las parejas de primer diseñados; con estos resultados se realizó una PCR con la cepa L605 como control positivo y tres muestras de materia fecal de cada uno de los tratamientos en las edades (15, 22 y 26 ±1 días) se utilizó las siguientes condiciones de PCR. (

Anexo I).

4 RESULTADOS

4.1 Aislamiento e identificación microbiológica de las BAL a partir de la leche de cerda

En la (**Figura 2**) se muestran la fotografía por microscopia electrónica que demuestra la aglutinación de la bacteria acido láctica L605, formando una especie de ramilletes de uvas en condiciones *in vitro* durante la prueba de adhesión y aglutinación a mannosa.

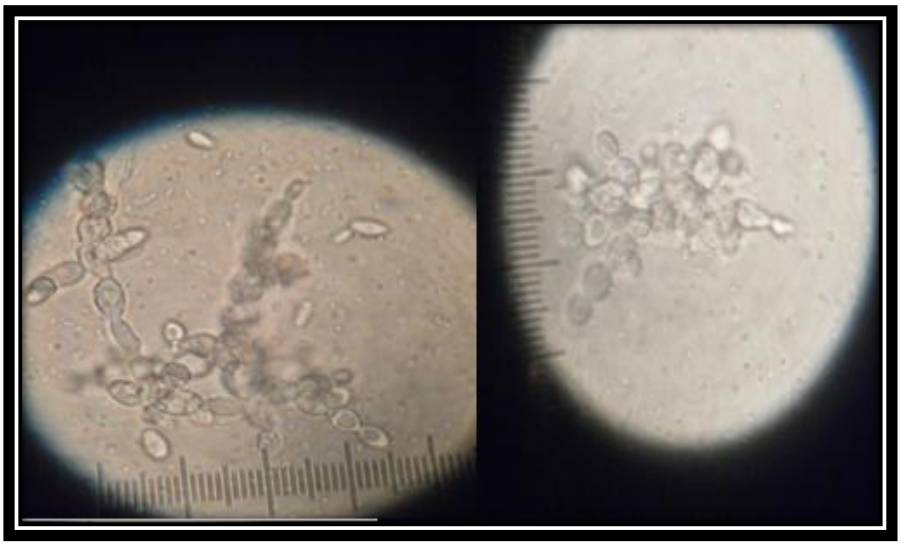


Figura 2. Microscopia electrónica prueba de adhesión y aglutinación de la bacteria L605

Las cepas L605, L628 aisladas de leche de cerda, la S66.7 y TVI 4.10 aisladas de un ensilaje y la cepa comercial Biosil, fueron las de mejor aglutinación en las pruebas de mannosa con diferentes diluciones (**Tabla 8**). En la dilución $\log_2$=4 (1:16) que corresponde a 100 µl de la suspensión de la bacteria en 1.5 ml de solución comercial PBS (buffer), la cepa L605 presentó una respuesta positiva a la prueba de aglutinación con resultados de crecimiento a 37ºC por 24 horas en agar MRS, 3.25 x 10^{12}UFC /ml y un pH 4.54, por lo cual se escogió para ser multiplicada como fuente de inoculo en la fermentación en campo, debido a que

esta cepa es aislada de leche de cerda y las otras pertenecen a otro tipo de sustratos o son de origen comercial.

Tabla 8. Prueba de adhesión y aglutinación a mannosa.

	Cepa				
Dilución	**L605**	**L628**	**S66.7**	**Tvi 4.10**	**Biosil**
(1 : 2)	+ ***	+ ***	+ ***	+ ***	+ ***
(1 : 4)	+ **	+ ***	+ **	+ ***	+ **
(1 : 8)	+ **	-	+ ***	+ **	+ ***
(1 : 16)	+ *	+ ***	+ ***	+ ***	+ **
(1 : 32)	+ **	-	+ ***	+ ***	+ ***

* Alto. ** Medio. *** Bajo.

La (**Tabla 8**) demuestra como la cepa L605 a partir de diferentes diluciones de la bacteria, presenta aglutinación. Fue la única cepa aislada de leche de cerda que presento mejor desempeño en la dilución 1:16 comparada con las demás cepas evaluadas teniendo en cuenta que pertenecen a diferente aislamiento (Leche y Ensilaje).

4.2 Extracción y amplificación de ADN

Extracción de ADN

El Kit Quiagen utilizado para la extracción de ADN total de la materia fecal de los lechones mostró calidad y alto peso molecular con buena pureza, libre de inhibidores o contaminantes (**Figura 3**).

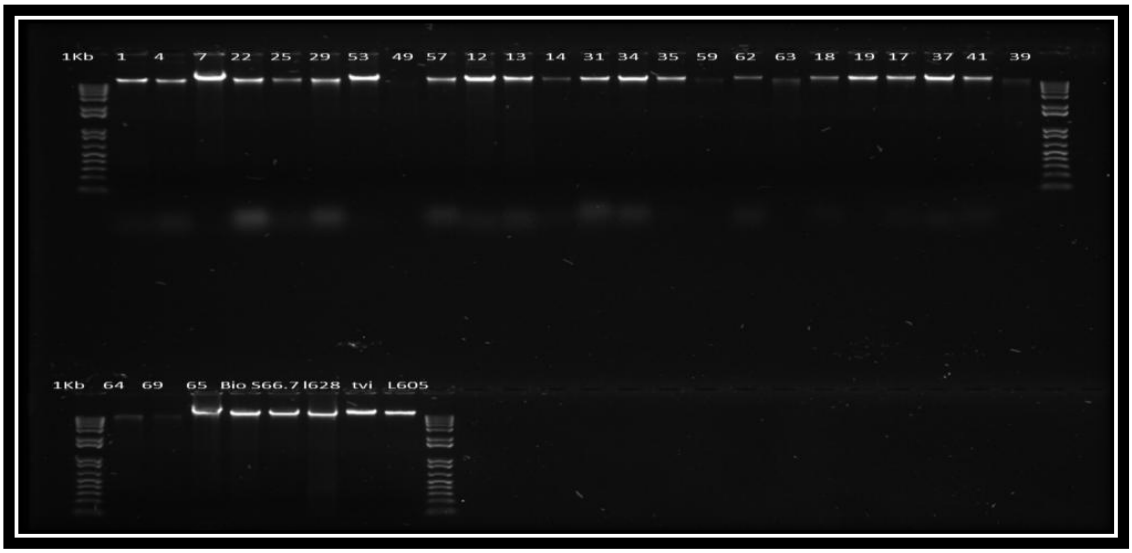


Figura 3. ADN total en la materia fecal

4.2.1 Amplificación por PCR

PCR Convencional de la región 16S

La técnica de PCR convencional corrido con la extracción de ADN de la cepa L605 cepa usada como inoculo con los diferentes *primers* nombrados en la (**Tabla 5**) demostraron que la cepa L605 pertenece efectivamente a la especie *Lactobacillus plantarum.* Puesto que al confirmarlo mediante la técnica de electroforesis donde claramente observamos 2 bandas amplificadas con cada

uno de la parejas de *primers*, la primera banda es de 250 bp de la pareja de *primers* Lpla-3 y la segunda banda pertenece al *primers* Plan F con 300 bp, el resto de cebadores utilizados no presentaron amplificación con la cepa de interés en la región conservada 16S (**Figura 4**).

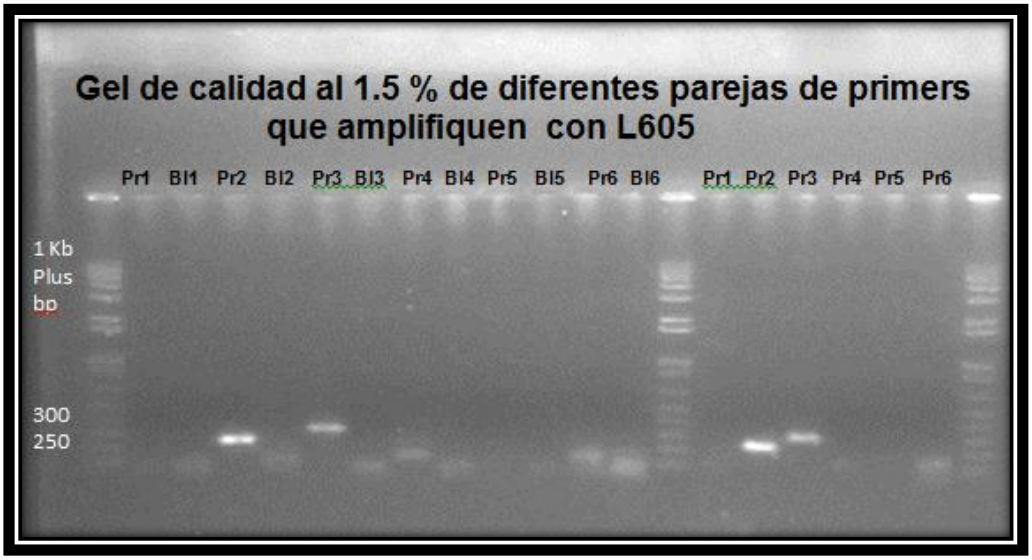


Figura 4. Amplificación pareja de primers con cepa L605.

Pareja de *primers*: Pr1=ParaF con su respectivo blanco Bl1; Pr2 = Lpla-3, Pr 3 = PlanF, Pr4=PentF, Pr5= Pec, Pr6=peN), todos con su respectivo blanco o control.

4.2.2 Estandarización y Cuantificación de BAL en heces de cerdo mediante Clonación y Q-PCR

4.2.2.1 *Clonación*

Al clonar los fragmentos de interés Lpla -3 y PlanF con el kit pgem®-t and pgem®-t easy vectorse obtuvieron una serie de fragmentos iguales para cada uno de los amplicones. Los pesos moleculares fueron superiores a la prueba anterior al clonado para el *primers* Lpla-3 ± 320 bp y PlanF ± 370 bp (**Figura 5**).

Versus 250 y 300 bp (Lpla-3 y PlantF). Esto se explicó por el uso de dos *primers* universales (Sp6 y T7) con un peso molecular de 70 bp .Al correr un test de PCR con el producto obtenido de la clonación, se verificó que verdaderamente los amplicones tenían el inserto del *primers* para la construcción de la curva de medida, que proporciona los rangos de cuantificación en ng/µl de *Lactobacillus plantarum* en las dietas ofrecidas y en la materia fecal de los lechones.

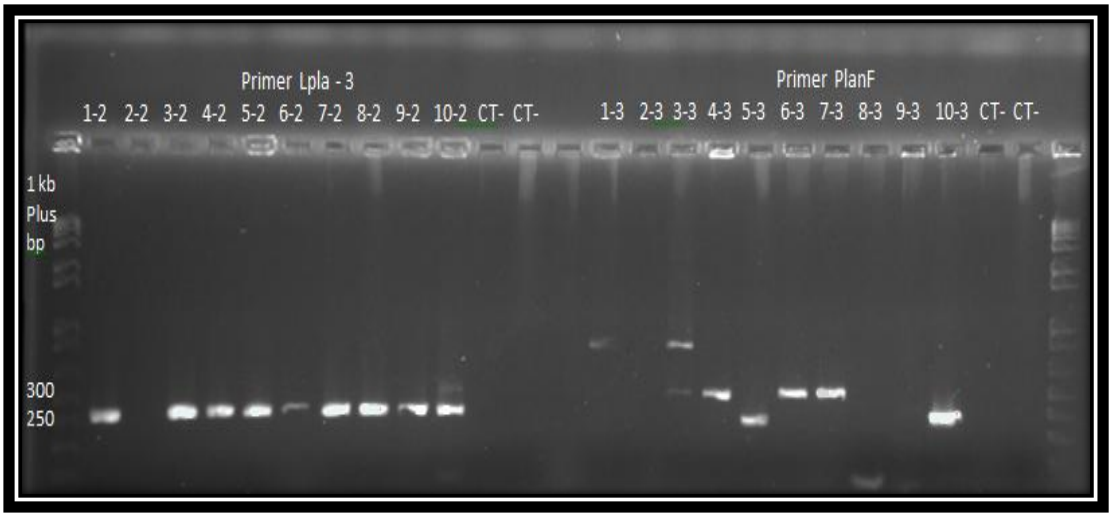


Figura 5. .Amplificación de los productos de clonación Lpla-3 y PlanF.

Pareja de *primers* Lpla-3= 1-2, 2-2, 3-2, 4-2, 5-2, 6-2, 7-2, 8-2, 9-2, 10-2, control negativo. 250bp

Pareja de *primers*PlanF= 1-3, 2-3, 3-3, 4-3, 5-3, 6-3, 7-3, 8-3, 9-3, 10-3, control negativo. 3OObp

Para efectos de diseño de la curva estándar se escogieron las siguientes bandas de cada una de las parejas de *primers* 3-2, 5-2, 8-2 para Lpla3 y 4-3, 6-3, 7-3 para Plant F. Marcador de peso de 1 kb plus

4.2.2.2 Estandarización Curva estándar del fragmento Lpla-3

Al obtener la amplificación del ADN de la cepa L605 con el cebador Lpla-3 y Plan F, después de correr el test de clonación a 20 colonias recombinantes, se procedió a determinar cuál de las bandas resultantes en este test, presentaron el peso molecular ideal de las muestras estudiadas para la pareja de *primers* (Lpla-3 y PlanF).Se escogieron los siguientes fragmentos amplificados en el gel de agarosa (**Figura 6**)

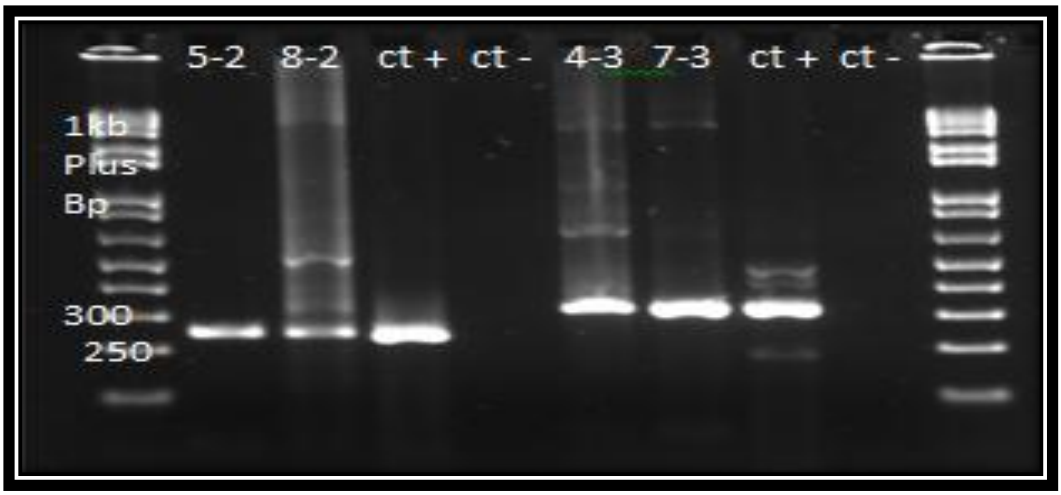


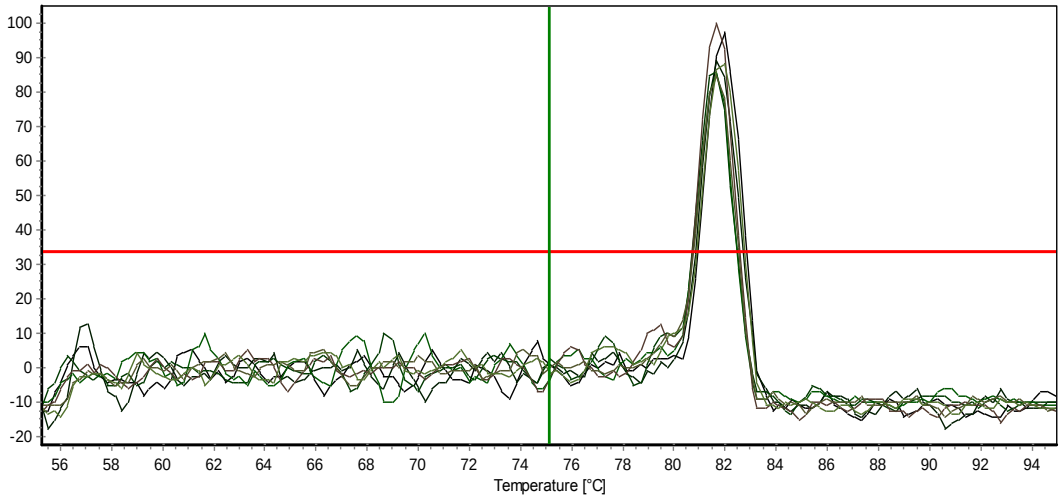
Figura 6. Verificación del ADN del plásmido.

Parejas de primer 5-2, 8-2 para Lpla3 y 4-3, 7-3 para Plant F. Marcador de peso de 1 kb plus.

Como resultado de esta verificación se determinó utilizar la colonia 5-3 con un peso molecular de 250pb del primer Lpla-3 para construcción de la curva estándar.

Se escogió la dilución seriada del plásmido (5-2) con el fragmento Lpla3 para la representación de la curva estándar mediante la técnica de Q-PCR.

En la curva de melting (**Figura 7**) obtenida, se observa un solo pico de disociación entre 80 -83 °C que fue estable para todas las amplificaciones obtenidas en las muestras de concentrado y heces a los 15, 22 y 26 ±1 días de edad. Esta grafica demuestra que el fragmento que se evaluó representó un solo amplicon y este es específico de *Lactobacillus plantarum*

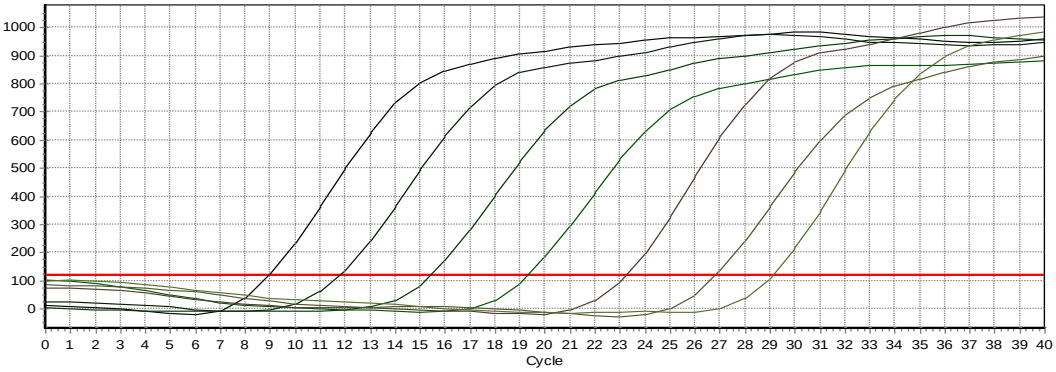


Threshold: 33%

Figura 7. Curva de Melting

Esta grafica permite ver la especificidad del *primers* a la hora de amplificar el *Lactobacillus plantarum* y poder cuantificarlo, esta fue nuestra regla de medición en las diferentes pruebas de la Q-PCR en la materia fecal a los 15, 22 y 26 días de edad del lechón, como también en los alimentos balanceados ofertados a los lechones.

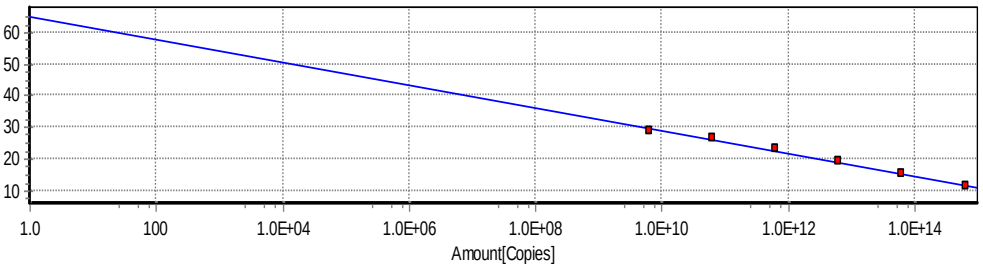
Las diluciones seriadas del plásmido (5-2), ajustadas con el número Avogadro (Park, 2005), muestran valores de ciclos acorde con las diluciones en la excitación del número de ciclos en relación del fluoroforo (**Figura 8**).



Threshold: 121 (Noiseband)
Baseline settings: automatic, Drift correction OFF

Figura 8. Diluciones seriadas del plásmido

donde se obtuvo un valor de correlacion cercano a 1 entre ciclos y numero de copias (**Figura 9**) lo que permitió definir la regla de medicion ng/ µl para cada una de las muestras totales obtenidas en la investigacion del aislamiento, selección y caracterización de la BAL.



Slope: -3.563
Y-Intercept: 64.82
Efficiency: 0.91
R^2: 0.994

Figura 9. Regla de medición para la cuantificación de *Lactobacillus plantarum*

4.2.3 QPCR

4.2.3.1 Cuantificación de Q-PCR en los diferentes tratamientos ofrecidos a los lechones

Mediante la técnica de Q-PCR se encontró que la cepa L605 al ser adicionada como fermentadora al alimento concentrado incremento la cantidad ng/µl de *Lactobacillus plantarum* en dietas ofertadas a los lechones con respecto a los otros tratamientos que no presentaron la inoculación de la cepa **(**

Tabla 9**)**

Tabla 9. Cuantificación de*Lactobacillus plantarum*(Log_{10} ng/µl)por Q- PCR en las dietas ofrecidos a los lechones

	PROMEDIO		
Tratamiento	**15 Días**	**22 Días**	**26 Días**
Control +	9.53 ± 0.56	9.15 ± 0.56	10.26 ± 0.56
Control -	9.34 ± 0.29	8.75 ± 0.29	9.12 ± 0.29
Fermentado	13.43 ± 0.19	13.81 ± 0.19	13.71 ± 0.19

FV	**Gl**	**SC**	**CM**	**Fc**
Tratamiento	2	37.34	18.67	131.34
Tiempo	2	0.32	0.16	1,13
Error	4	0.57	0.142	

P>0.083 se demuestra una tendencia estadística entre los tratamientos

Número de copias de L*actobacillus* por Q-PCR obtenidas de los diferentes dietas ofrecidas a los lechones a los 15,22 y 26 días de edad, como CT +(Tratamiento Control Positivo con el 21% de Proteína); CT – (Tratamiento Control Negativo con el 18% de Proteína); FERMTADO (Tratamiento Control Negativo con el 18% de Proteína + la Adición de la bacteria acido láctica L605 como fermentadora), en la parte inferior observamos la andeva del diseño experimental Gl (Grados de libertad); SC (Suma de cuadrados); CM (Cuadrado medio); Fc (F calculada)

4.2.3.2 Cuantificación de Q-PCR de la materia fecal de los lechonesen los diferentes tratamientos

Esta técnica permitió medir cuantos ng/µl de *Lactobacillus plantarum* se encontraron en la materia fecal de los lechones (**Tabla 10**) al pasar por el tracto gastrointestinal las dietas con y sin el inoculo de la cepa L605 en las diferentes edades de toma de muestras.

Tabla 10. Cuantificación por Q- PCR de *Lactobacillus plantarum* (Log_{10} ng/µl) de la materia fecal de los lechones en las diferentes dietas

	PROMEDIO			
Tratamiento	**15 Días**	**22 Días**	**26 Días**	
Control +	10.33 ± 0.93	10.26 ± 0.87	9.95 ± 0.87	
Control -	9.32 ± 0.17	9.88 ± 0.99	9.35 ± 0.81	
Fermentado	9.62 ± 0.75	10.24 ± 0.37	9.18 ± 1.0	
FV	**Gl**	**SC**	**CM**	**Fc**
Tratamiento	2	0.71	0.35	0.90
Tiempo	2	0.60	0.30	0.77
Error	4	0.25	0.39	

P>1.38 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Número de copias de *Lactobacillus plantarum* por Q-PCR obtenidas de las heces de los animales a partir de los diferentes tratamientos. CT + (Tratamiento control positivo con el 21 % de proteína); CT – (Tratamiento Control Negativo con el 18% de Proteína); FERMT (Tratamiento Control Negativo con el 18% de Proteína + la Adición de la bacteria acido láctica L605 como fermentadora). Las muestras fueron tomadas a los 15, 22 y 26 días de edad, en la parte inferior de la tabla observamos la andeva del diseño experimental Gl (Grados de libertad); SC (Suma de cuadrados); CM (Cuadrado medio); Fc (F calculada)

En los resultados encontrados mediante el uso de la técnica molecular Q-PCR con las muestras de materia fecal de los animales, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (P>0.05) (**Tabla 11**) entre los tratamientos con la adición de la cepa de *Lactobacillus plantarum* tampoco se encontraron diferencias entre las edades de toma de muestra.

Según lo reportado por (Lähteinen, 2013 y Corthesy et al., 2007) tampoco se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento control y la dieta experimental que contenía *Lactobacillus brevis* en lechones post destete, alimentados mediante la fermentación de la dieta y la adición de la cepa probiótico en el agua de bebida.

Tabla 11. Cantidad del genero *Lactobacillus plantarum* región 16S (Log_{10} ng/µl) en la materia fecal por la técnica de Q-PCR

	Edad del lechón		
Tratamiento	**15 Días**	**22 Días**	**26 Días**
Negativo	9.32 ± 0.07	9.88 ± 0.41	9.35 ± 0.33
Fermentado	9.62 ± 0.31	10.24 ± 0.15	9.10 ± 0.45
Positivo	10.33 ± 0.38	10.26 ± 0.36	9.95 ± 0.36
Probabilidad (P)	0.064	0.64	0.35

P < 0.05 hay diferencias estadísticamente significativas letras diferentes indican que no hubo diferencias

4.2.3.3 Diseño de *primers* diagnósticos para la detección de BAL L605

4.2.3.3.1 RAPD'S

Esta prueba molecular determinó que la bacteria L605, aislada de leche de cerda se detectó de forma rápida mediante el diseño de un *primers* especifico, el cual

permitió solo amplificar la cepa L605 y no a todos los *Lactobacillus plantarum.* Como se muestra en la (**Figura 10)**

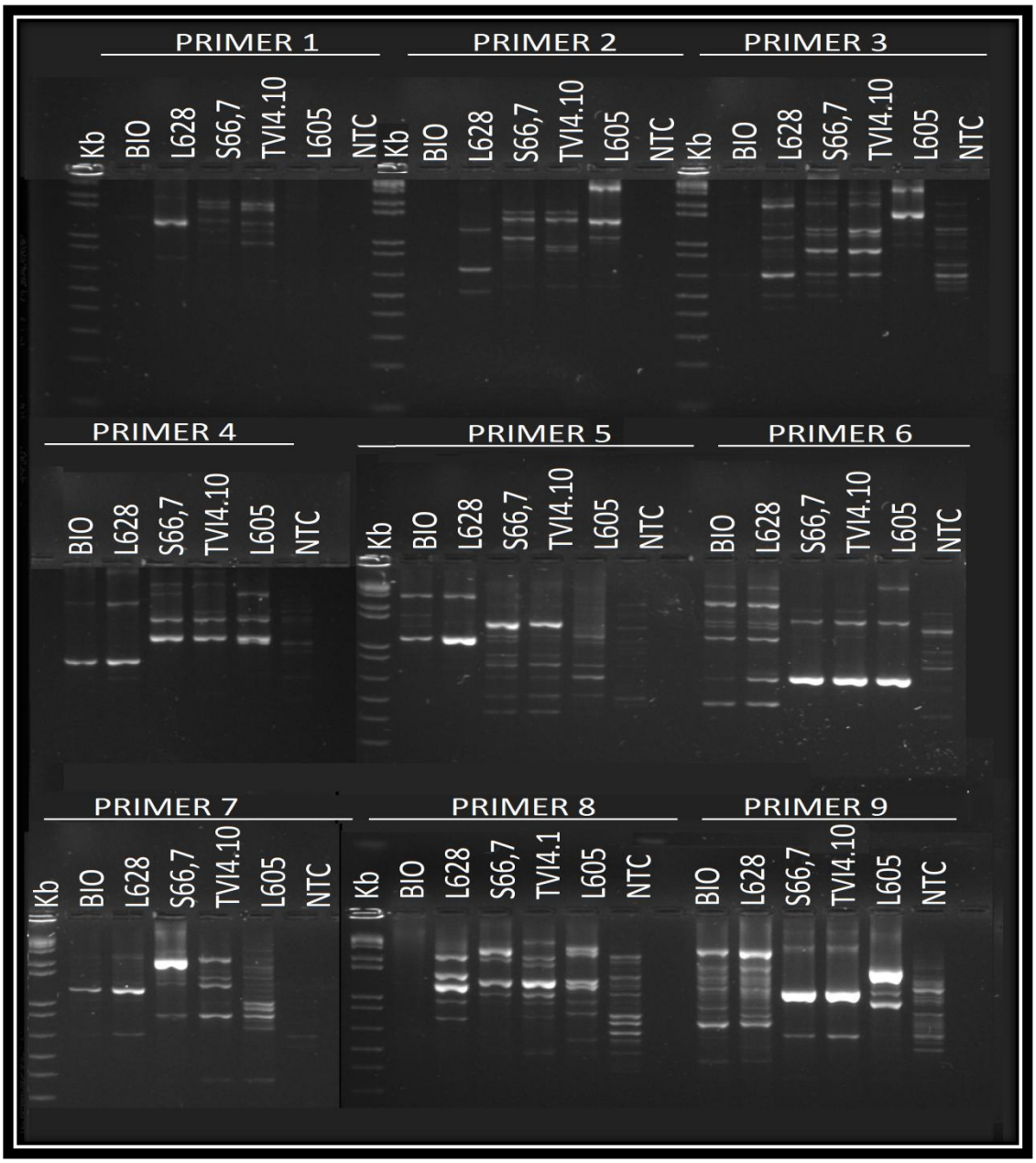


Figura 10. Especificidad aleatoria del pool de cepas usando la técnica de los RAPD's.

cada uno de los nueve *primers* utilizados para encontrar bandas especifica de la cepa L605, con respecto a las demás cepas que mostraron un patrón de bandeo similar entre ellas, como por ejemplo la muestra biosil (BIO) cepa comercial y la

cepa L628 extraída de leche de cerda las cuales presentaban bandas polimórficas del mismo peso molecular.

Los *primers* que presentaron mayor especificidad fueron 2, 3 y 9 mostraron bandas específicas para la cepa L605 (**Figura 10**). La corrida en el gel de agarosa permitió observar de una manera más clara el comportamiento de la cepa L605 con los *primers* seleccionados a secuenciar (**Figura 11**),

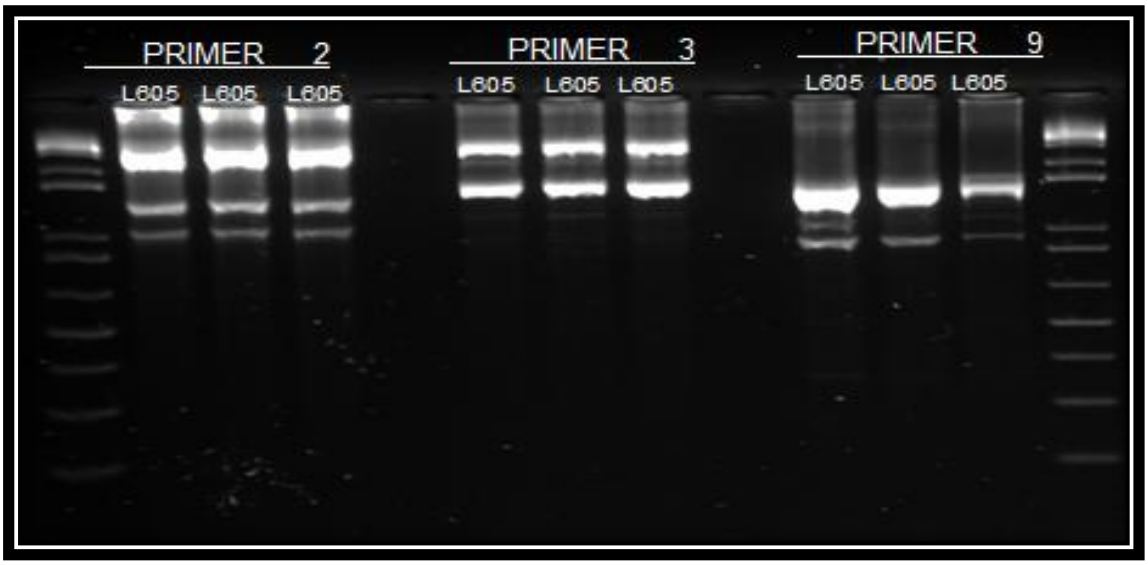


Figura 11. Amplificación de la extracción de ADN de la cepa L605 con los *primers* específicos 2, 3 y 9

Al llegar las secuencias de los ampliaciones de la cepa L605 con respecto a los *primers* 2, 3 y 9. Por medio de la herramienta de bioinformática NCBI, Clustal W se procedió a comparar las secuencia obtenidas con el genoma completo del *Lactobacillus plantarum* WCFS1, observando que la banda del primer 2 presentó un 100%, la banda del 9 un 90% y la 3 un 20% de identidad con la del *Lactobacillus plantarum*. La secuencia del *primers* 3 no se tuvo en cuenta en el diseño de *primers* específico para la detección de la BAL L605.

A partir de los resultados obtenidos anteriormente se utilizó el programa bioinformatico para diseño de los *primers* de las secuencias obtenidas con la cepa L605 **(Tabla 12**).

Tabla 12. Secuencias de *primers* diseñados a partir del aislamiento.

Secuencia Nombre	Secuencia (5' - 3')	Annealing temp °C	Especie
LacPla 1	F- GGAAAGAGGTTCTTGATCTT	57	*L. plantarum*
	R- CCTAGTCTCAATCGACATTT		
LacPla2	F- GGAAAGAGGTTCTTGATCTT	58	*L. plantarum*
	R-CGTACACCACTAACAGGAAT		
LacPla 3	F- ATTCCTGTTAGTGGTGTACG	58	*L. plantarum*
	R- TAGCTATGTATTCGGGTGAT		
LacPla 4	F- CTTCACTAACCACAAGGATT	57	*L. plantarum*
	R- GCGATTATCAGCTATCAAG		
LacPla 5	F- GTTGGTAATTCTGGTTGATG	58	*L. plantarum*
	R- CGTGCAGGTTATAGTTTCA		
LacPla 6	F- ATCAGACAAACGTCCTCTTA	57	*L. plantarum*
	R-AATCCTTGTGGTTAGTGAAG		

Los resultados obtenidos en la prueba de especificidad de los *primers* y de las condiciones de hibridación las cuales son las apropiadas para la amplificación del *Lactobacillus plantarum*. Mediante la prueba diagnóstico, se determinó la presencia de la bacteria L605 inoculada en el tratamiento fermentado, lo cual demuestra que los *primers* diseñados a partir de la secuencia obtenida son específicos para amplificar la bacteria inoculada y no otras bacterias ácido láctico. Esta prueba de especificidad fue montada con los ADN total extraídos de las dietas suministradas a los lechones, además de una muestra de un probiotico comercial y materia fecal de uno de los lechones que consumió de la dieta fermentada, de gran importancia para determinar la amplificación de la cepa L605 (

)

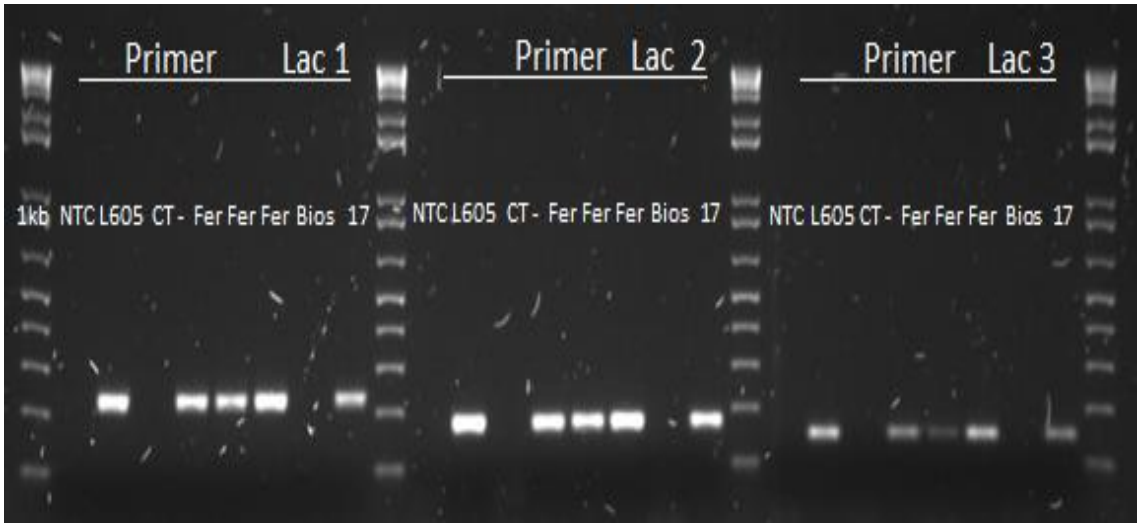


Figura 12. Especificidad de los *primers* con respecto a la BAL L605 en alimento concentrado y materia fecal.

NTC: Control con agua L605: Cepa aislada de leche de Cerda. CT - : tratamiento control negativo. A los 26 días. Fer: Tratamiento fermentado a los 26 días con la inclusión de la BAL L605. BIOS: Cepa Biosil *Lactobacillus plantarum. 17:* Corresponde a la materia fecal del lechón 7, a los 15 días edad en el tratamiento fermentado con inclusión de la cepa L605.

Al obtener los resultados del amplificado en el gel vemos claramente que los *primers* Lac 1, 2, 3 con respecto al control positivo son los que más confiabilidad nos da en los resultados de detección de la cepa L605 en la materia fecal de los animales muestreados a los 15,22 y 26 ±1 días de edad. Los *primers* 4, 5 y 6 no mostrados en el gel presentaron comportamientos poco confiables en el diagnostico debido que su amplificación con respecto al positivo ADN de la cepa L605 no mostro patrón de bandeo (**Figura 13**). Se muestra como los tres primeros *primers* detectan la presencia de la bacteria L605 amplificando para todos los lechones muestreados banda, al parecer esta amplificación en animales que no fueron inoculados con la cepa presentaron bandeo debido a que la cepa es aislada de leche de cerda y estos animales estuvieron con sus madres es fisiológicamente probable que exista este *Lactobacillus plantarum* L605 en el tracto intestinal de los lechones. Se denota mayor patrón de bandeo

en los animales muestreados con la dieta fermentada sobre todo a los 15 días de edad del lechón con respecto a la cepa L605.

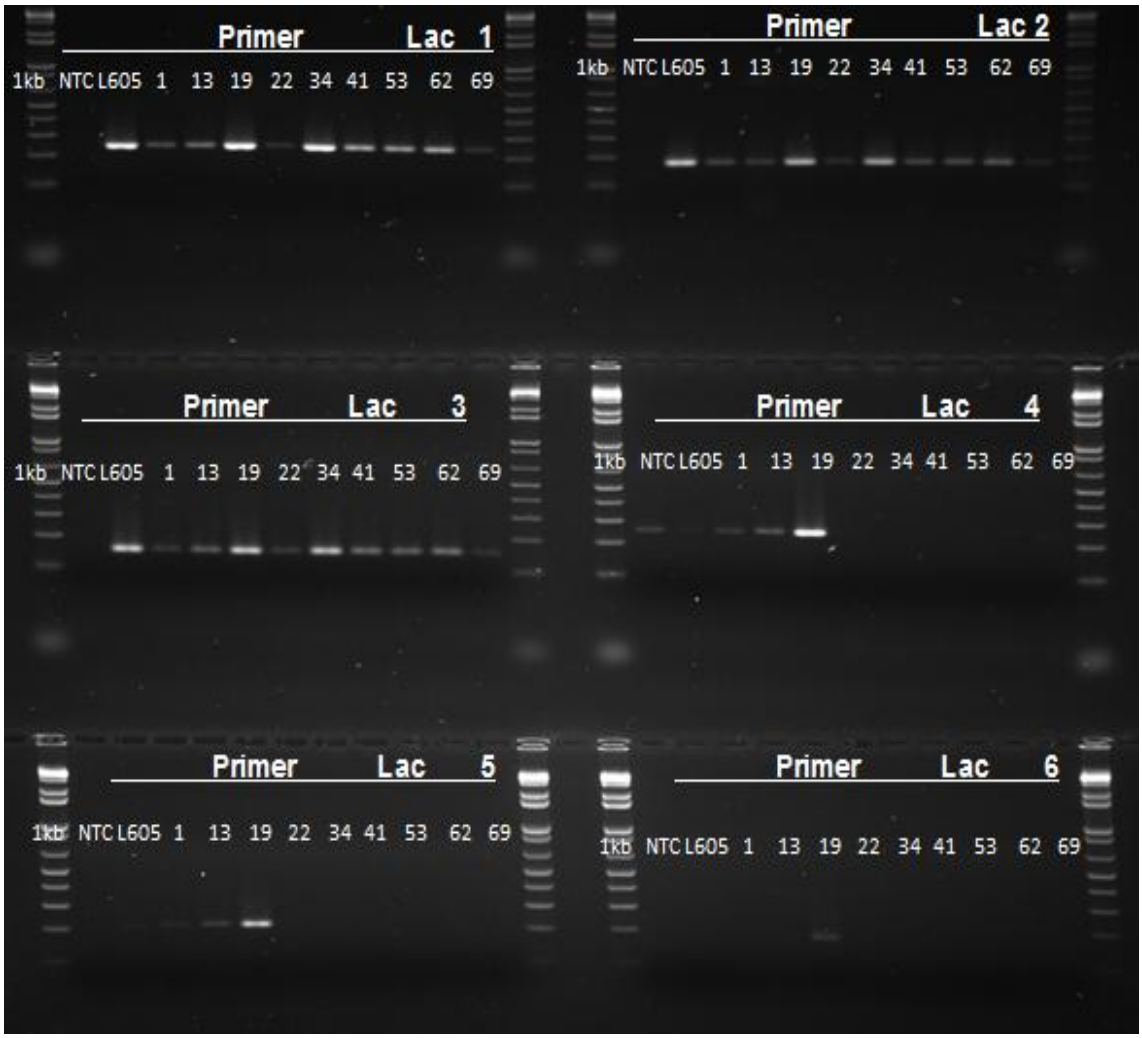


Figura 13. Amplificación de ADN de materia fecal con las parejas de *primers* diseñadas a partir de la secuencia de la cepa L605

NTC: Control con agua L605: Cepa aislada de leche de Cerda. 1, 22 y 53: Corresponde a la materia fecal del lechón 3 en sus diferentes edades 15, 22 y 26 días en el tratamiento control positivo. 13, 34 y 62: Corresponde a la materia fecal del lechón 7 en sus diferentes edades 15, 22 y 26 días en el tratamiento control negativo. 19, 41 y 69: Corresponde a la materia fecal del lechón 5 en sus diferentes edades 15, 22 y 26 días

4.2.4 Diarreas

La presencia o ausencia de las diarreas fue medida en los lechones a los 15, 22 y 26 ±1días de edad, encontrándose que los lechones que fueron inoculados con la cepa L605 no presentaron diarreas en comparación de algunos lechones muestreados del tratamiento control positivo **(Tabla 13).**

Tabla 13. Presencia o ausencia de diarreas a los 15, 22 y 26 ±1 días de edad de los lechones

Diarrea 15, 22 y 26 ±1 días de edad			
		Diarrea	
Numero de lechón	**Tratamiento**	**Presencia**	**Ausencia**
3	Control +	Con	
1	Control +		Con
13	Control +		Con
10	Control +	Con	
23	Control +		Con
6	Control +		Con
7	Control -		Con
12	Control-		Con
20	Control -	Con	
2	Control -		Con
4	Control -		Con
8	Control -		Con
22	Fermentado		Con
28	Fermentado		Con
37	Fermentado		Con
9	Fermentado		Con
5	Fermentado		Con
21	Fermentado		Con

5 DISCUSIÓN

La cepa L605, es una bacteria que procede de un aislamiento de leche de cerda. Esta cepa presentó mayor adhesión y aglutinación a la prueba de mannosa que los demás aislamientos evaluados. Esta característica es deseable por que se ha comprobado que está relacionada con una mayor capacidad de colonización del tracto digestivo y tiene mayor potencial probiotico (Jankovic *et al.,* 2010). Tambien mejora el sistema inmunológico, porque colonizarlas paredes del TGI según Raibaud, 1992. Berg, 1996 y Vaughan, 1999. Al colonizarse el TGI con bacterias ácido lácticas se transforma en un ecosistema complejo formado por elementos bióticos tales como microorganismos nativos, transitorios, células del epitelio intestinal, constituyentes de la dieta o componentes abióticos, y elementos endógenos como la saliva, las secreciones o excreciones de los diferentes órganos del tubo digestivo, las enzimas y las hormonas, entre otros. El equilibrio de este ecosistema depende en gran medida de la microbiota intestinal nativa, la cual es poco estable en individuos jóvenes. El problema es mayor en las primeras semanas posdestete y da paso a la rápida colonización de microorganismos patógenos. Debido a las enormes pérdidas económicas por diarreas y otras disfunciones gastrointestinales el uso de una cepa como la L605 aislada de la leche de cerda, puede promover un efecto positivo en la replicación de los microorganismos benéficos para el mantenimiento de la salud del hospedero.

La bacteria acido láctica L605 proporciona efectos benéficos de salud en los lechones posdestetos debido a que disminuye la incidencia de diarreas. Algunos autores establecen que la inoculación de especies de BAL como *Lactobacillus helvicus*, *Lactobacillus brevis*, presentan en la producción porcina (Warren et al., 2007; Pluske, 2005; Sheppach, 1994) una reducción de bacterias no benéficas como *Escherichia coli* que en ocasiones generan pérdidas tanto de salud como económicas debido a la incidencia de antibiótico como cocideocidas que generalmente crean resistencia a bacterias no benéficas en el hospedero.

La cepa L605 presentó un comportamiento de bacteria acido láctica debido a que microbiológicamente mostró una buena adhesión a mannosa que presumiblemente, beneficia al hospedero debido a que mejora la modulación de la microflora intestinal del lechón.

Estos resultados nombrados acerca de que la cepa, L605 es una opción al uso de antibiótico estan acorde con Fuller, 1997. Gilliland, 1980. Schrezenmeir, 2001. Vvanhoutteet all, 2006 yHavenaar, 1992. Quienes anotaron que la utilización de probioticos aislados de una especie, para ser inoculado en otro tipo de especie diferente de donde se obtuvo, en ocasiones no muestran efectos viables para el animal en condiciones de sanidad. La utilización de bacterias provenientes de la misma especie protege el estado de sanidad en lechones por el destete a edades tempranas (21-28 días).

Plevy, 2002 encontró que en la producción porcina se han utilizado probióticos comerciales de origen no natural es decir bacterias genéticamente manipuladas en la alimentación de lechones con concentraciones de BAL 6.0* 10^{10} UFC/mL. Estos datos son muy similares a los encontrados en nuestra investigación los cuales provienen de microorganismos naturales aislados de leche de cerda los cuales compiten con productos de diferente origen, además de poder colonizar más rápido que otras especies el TGI.

Taras, 2007 y Tuomola, 2001 determinaron que las BAL inoculadas en los alimentos concentrados, con 24 horas de fermentación y con una temperatura promedio 29°C disminuían el pHa 4.5.Valores similares se encontraron para la inclusión de la BAL L605 garantizando un valor adecuado de pH para la fermentación del alimento en condiciones de campo.

La BAL *Lactobacillus plantarum* L605 produjo una disminución de signos de transito rápido en lechones tal vez asociados a proliferación de microorganismos

patógenos, lo anterior está acorde con Jehanno, et al, 1992; Jurado 2013 quienes demostraron que la inoculación de *Lactobacillus plantarum* en dietas para lechones presentó un número importante de bacterias capaces de controlar bacterias patógenas. Esta podría ser una explicación del efecto que realizaron las bacterias ácido láctico en el presente estudio.

Garcia, 2005. Fuller, 1989 y Ziemer, 1998 afirman que las BAL debe poseer varias propiedades para ser considerada un buen probiótico: ejercer un efecto benéfico en el hospedero, estabilidad de ácidos y sales biliares de forma que pueda colonizar el ambiente intestinal y capacidad de adhesión a las superficies de las mucosas.

En la investigación que se realizó la BAL L605 se inoculo en el alimento balanceado como vehículo, para que pudiese viajar a través del TGI colonizando hasta llegar al intestino delgado y colon donde, se presume que hay mayor absorción de nutrientes. Evidenciado mediante la aparición de la cepa en la materia fecal esto daría un indicio de que la cepa paso a través de TGI tal vez colonizando por esta razón, los animales que se les suministro el alimento fermentado con la cepa L605 no presentaron diarrea a los 22 y 26 días de edad post destetos mientras que algunos animales del tratamiento control + al cual no se adiciono la BAL L605 si presentaron diarrea en la toma de muestra a los 22 y 26 días de edad. Las bacterias acido lácticas útilizadas como probiotico, son adicionados a los animales en un vehículo bien sea el alimento o el agua de bebida con el fin de pasar a través del TGI del animal para garantizar que la cepa bacteriana ejerza su máximo acción colonizando las paredes TGI efectuando una mayor absorción de las materias primas (Castillo et al, 2007).

La prueba realizada mediante la técnica de Q-PCR, permitió cuantificar de manera rápida y eficaz la cantidad de *Lactobacillus plantarum* en la materia fecal entre los tratamientos evaluados, los días 15, 22, 26 ± 1 de edad del animal.

Por lo tanto se podría determinar que lechones a edades tempranas (15 días) la carga bacterial de *Lactobacillus plantarum* suministrada a través del inoculo comparada con la carga bacterial nativa suministrada por la toma de leche materna en los primeros días de edad se encuentra en las mismas proporciones, asumiendo que los animales en edades jóvenes presentan la misma alimentación lactica por esta razón no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados en la materia fecal de los animales tratados y no tratados con la bacteria L605.

Lähteinen, 2013.Kurzak, 1998.Corthesy et al., 2007 y Wells, 2011b.Determinan que aunque no se encuentren diferencia significativas en la adición de BAL a la alimentación de los lechones con respecto al tratamiento control, si se nota que debido a la inclusión de la bacteria de especie *Lactobacillus* podría generar una inmunomodulacion del TGI

La prueba permitió determinar de que hay un crecimiento exponencial de *Lactobacillus plantarum* en la inoculación de la dieta antes de ser suministrada al animal, indicando fueron óptimas con respecto a las dietas no inoculadas con la cepa de interés.

Brizuela, 2003 demostró que el *Lactobacillus plantarum* es capaz de crecer y multiplicarse en presencia de altas concentraciones de sales biliares similares a las que se encontraron en el intestino. Resultados encontrados por técnicas moleculares en la investigación podrían confirmar la presencia o ausencia de las BAL.

Se observó en pruebas de campo de nuestra investigación que los animales tratados con la adición de la cepa L605 *Lactobacillus plantarum* presentaron aceptación al consumo de la dieta fermentada como también valores interesantes en la ganancias de peso esta tendencia fue similar a lo reportado por Lessard y Brisson 1987, quienes comprobaron que la adición a lechones de un producto fermentado por *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacilluscasei* y

Streptococcus thermophilus daba un incremento significativo de la ganancia en peso y conversión alimenticia del animal.

.

En este mismo sentido Song 2000, determina la rápida amplificación de las bacterias presentes en el intestino humano mediante la técnica de PCR convencional la cual consiste en la amplificación de un gen a través de una región conservada 16S–23S rRNA y su visualización mediante un gel de agarosa donde el patrón de bandeo es determinado por la cantidad de pares de bases del amplicon.

.

Por otro lado aunque no fue objeto de estudio, algunos autores como Gómez, 2008 determino que cuando el destete ocurre a los 35 días de edad, la altura de las vellosidades se reduce de 410 a 299 µm en tan solo 3 días, y es más abrupto cuando se desteta a los 21 y 28 días de edad. Estos déficit de vellosidades podrían ser corregidos con la inclusión de dietas liquidas fermentadas con la cepa *Lactobacillus plantarum*. Se podría inferir que el destete precoz de los sistemas de producción porcino no alcanzan en tan poco tiempo la madurez de la microflora intestinal limitando el crecimiento de los animales como también el estado de sanidad. Se esperarían resultados similares y positivos con la inclusión de la cepa L605 como sabemos es un *Lactobacillus plantarum* aislado de la leche de cerda el cual beneficia el animal en su conversión alimenticia comprobado por Ocampo en el 2013 con mediciones en campo de la inclusión de la cepa L605.

6 CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

El aislamiento BAL L605 a partir de la leche de cerda mostró resultados de interés en la colonización del tracto intestinal de los animales debido a que esta bacteria aislada e inoculada sobre el mismo hospedero presenta una acción benéfica en el estado de salud del animal mediante la disminución de los episodios de diarreas con respecto a los animales que no se inocularon.

La inoculación de la BAL L605 en el alimento concentrado mostró una tendencia al aumentar la cantidad de *Lactobacillus plantarum* en relación a las dietas que no fueron inoculadas, siendo un factor benéfico en la etapa crítica del destete precoz.

La adición de un microorganismo como la BAL L605 con acción probiótico representara una solución preventiva a los problemas de salud de los lechones destetos precozmente a productores, debido a que los altos costos se generan en la compra de antibióticos.

Las técnicas moleculares permitieron la detección y cuantificación de *Lactobacillus plantarum* en materia fecal. Es un camino técnico ventajoso porque no requiere el sacrificio del animal, además de disminuir las pérdidas de parámetros productivos por estrés.

La elaboración de *primers* específicos para la detección de cepa L605 *Lactobacillus plantarum* es un aporte importante en la rápida identificación de la cepa a nivel molecular para estudios posteriores de evaluación de la bacteria.

Se recomienda profundizar el estudio de la cepa bacterial L605 *Lactobacillus plantarum* con parámetros zootécnicos y de morfología del epitelio intestinal, dados el potencial mostrado en las pruebas aquí estudiadas.

Se recomienda hacer una serie de muestreos de leche de cerda en diferentes unidades de producción porcina del país para establecer comparaciones de la bacteria aislada en condiciones del Valle del Cauca como probiótico.

Se recomienda con los *Primers* ya elaborados correr pruebas moleculares con mayor especificidad en la problemática que afronta la porcicultura colombiana en el uso de antibióticos, en relación a la prohibición de antibióticos en cerdos en Europa.

7 BIBLIOGRAFIA

- **ACP.** Asociacion Colombiana de Porcicultura. informe economico del sector porcicola. [En línea] enero de 2011. [Citado el: 26 de enero de 2012.] http:// www.porcicol.org.co.

- Asociación Colombiana de Porcicultores-Fondo Nacional de la Porcicultura. Área Económica. Septiembre de 2012. Accesado el 23 de Abril del 2014.

- Almenza, F., Barrera, E. 1991. Tecnología de leche y derivados, Bogotá Unisur p. 61- 66.

- Axelson, S. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. En Lactic Acid Bacteria.Microbiological and Functional Aspects p. 1-72.

- Azaïs-Braesco, V., Bresson, J.L., Guarner, L., Corthier, G. 2010. Not all lactic acid bacteria are probiotics, but some are. British Journal of Nutrition, 103: 1079-1081

- Beuvier, E., Berthaud, K., Cegarra, S., Dasen, A., Pochet, S., Buchin, S., Duboz, G. 1997. Ripening and quality of Swiss type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. International Dairy Journal. 7: 311-323

- Berrecal, D., Arias, M.L., Henderson, M. 2002. Evaluación de la actividad de cultivos probioticos sobre Listeria monocytogenes durante la producción y almacenamiento de yogur. ALAN. [online]. vol.52, no.4 [citado 13 octubre de 2007], p.375-380. Disponible en la World Wide Web: [1]. ISSN 0004-0622.

- Berg, R.D. 1996. The indigenous gastrointestinal microbiota. Trends inMicrobiology, 4: 430-435.

.

- Bokulich, N.A., Mills, D.A. 2012. Differentiation of mixed lactic acid bacteria communities in beverage fermentations using targeted terminal restriction fragment length polymorphism Food Microbiology, 31:126-132

- Brizuela, M.A. 2003. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probiótica y su evaluación en cerdos. [Tesis doctoral] La Habana: Instituto Cubano de los Derivados de la Caña de Azúcar, ICIDCA, Facultad de Ciencias Veterinarias

- Cagigas, A., Blanco, J. 2002. Prebióticos y Probioticos, una relación Beneficiosa Revista cubana. Aliment Nutri 8 - 63

- Caja, G., González, E., Flores, C., Carro, M., Albanell, E. 2003. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario, Probioticos, Enzimas y ÁcidosOrgánicos.XIX CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA

- Canibe, N.A., Jensen, B.B. 2012. Fermented liquid feed—Microbial and nutritional aspects and impact on enteric diseases in pigs Animal Feed Science and Technology, 173: 17– 40

- Castillo, M., Martin-Orue, S.M., Manzanilla, E.G., Perez, B.J.F., Gasa, J. 2006. The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in earlyweaned pigs. J Anim Sci, 84: 2725–2734.

- Castillo, M., Martin-Orue, S.M., Nofrarias, M., Manzanilla, E.G., Gasa, J. 2007. Changes in caecal microbiota and mucosal morphology of weaned pigs. Vet Microbiol, 124: 239–247.

- Choct, M., Selby, E. A. D., Cadogan, D. J., Campbell, R. G. 2004.Effects of particle size, processing, and dry or liquid feeding on performance of piglets. Aust. J. Agric. 55: 237-245.

- Casas, I. 1999. Cómo trabajan los oligosacáridos mananos. Feeding Times. 4: 7-9.

- Cook, B.G., Pengelly, B.C., Brown, S.D., Donnelly, J.L., Eagles, D.A., Franco, M. A., Hanson, J., Mullen, B.F., Partridge, I.J., Peters, M., Schultze-Kraft, R. 2005. Tropical forages: an interactive selection tool. [CD-ROMs], csiro,dpi&f(qld), CIAT LRI, Brisbane, Australia.

- Cooper, E.R., Siewicki, T.C., Phillips, K. 2008.Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. Science of the Total Environment, 398: 26-33.

- Copyright 2005-2009 (C) Macrogen Inc. All rights reserved. 908 World Meridian Venture Center, #60-24, Gasan-dong, Geumchun-gu, Seoul 153-781, Korea.

- Corthesy, B., Gaskins, H.R., Mercenier, A. 2007.Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. J. Nutr. 137: 781-790.

- Cromwell, G.L. 2002. Why and how antibiotics are used in swine production. Anim Biotechnol, 13: 7-27

- Deman, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E.1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Bacteriol, 23:130.

- Deprez, P., Deroose, P., Van Den Hende, C., Mulle, E., Oyaert, W. 1987. Liquid versus dry feeding in weaned piglets: the influence on small intestine morphology. J. Vet. Med, 34: 254-259.

- Dobrogsz, W.J., Black, B.L., Casas, I.A. 1991. Delivery of viable Lactobacillus reuteri to the gastrointestinal tract of poultry. Poultry Science, 70: 158.

- Dorman, H.J., Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants. Antibacterial activity of plant volatile oils. App Microbiol, 88: 308-316

- FAO, 2006.functionhttp://www.fao.org/docrep/009/a0750s/a0750s00.htm. Accesado el 14 de Agosto del 2012.

- FAO., OMS. 2001. Informe de la consulta de expertos FAO/OMS sobre evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probioticos en los alimentos, incluida la leche en polvo con bacterias vivas de ácido lácticas.Cordoba, Argentina, ISSN 1014-2916.

- Fenell, C., Michetti, P. 2003. Probiotics and Helicobacter pylori. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol, 17:785-791.

- Fernández, M. 1997. The role of airway resistance in the diagnosis of bronchial hyperreactivity. J Invest Allergol Clin Immunol, p. 286-287.

- Ferket, C. 2002. Beneficios de dietas suplementadas con antibióticos versus oligosacáridos mananos en pollos broilers. Dep. de Ciencia Aviar, North C. State University, p. 21

- Figueroa, J.L., Chi-Moreno, E.E., Cervantes, M., Domínguez, I.A. 2006. Alimentos funcionales para cerdos al destete. Vet Méx, 37: 117-136.

- Foligné, B., Dewulf, J., Breton, J., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Pot, B. 2010. Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: Immunomodulation by *Oenococcus oeni*. International Journal of Food Microbiology, 140:136–145.

- Fooks, L.J., Fuller, R., Gibson, G.R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. Int. Dairy J., 9: 53-61.

- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66: 365-378.

- Fuller, R. 1992. History and development of probiotics. En: Probiotics: The ScientificBasis, R. Fuller (Ed.). Londres, Chapman & Hall. Pp 1-8.

- Fuller, R. 1997. Introduction. En: Probiotics: 2. Applications and Practical Aspects, R.Fuller Ed. Londres, Chapman & Hall, p. 1-9.

- García, Y., García, Y., López, A., Boucourt, R. 2005. Probioticos: una alternativa para mejorar el comportamiento animal. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 2: 129-140.

- Gilliland, S.E., Bruce, B.B., Bush, L.J., Staley, T.E. 1980. Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophillus*as dietary adjuncts for young calves. Journal of DairyScience, 63: 964-972.

- Genome, 2014. http://www.genome.jp/tools/clustalw/. Accesado 18 de Marzo del 2014.

- Gómez, A., Vergara, D., Argote, F. 2008. Efecto de la dieta y edad del destete sobre la fisiología digestiva del lechón. Rev Bio Agro, 6: 32-41.

- Goodband, R.D., Tokach, M.D., Dritz, S.A., NIELSEEN, J.L. 1995. Practical Nutrition for segregated early weaned pig. En: Proc. Saskatchewan Pork IndustrySymposium, Saskatoon, Canadá. p. 15-22.

- Hamilton-Miller, J.M. 2003. The role of probiotics in the treatment and prevention of Helicobacter pylori infection. International Journal Antimicrobial Agents, 22; 360-366

- Han, K.S., Balan, P., Gasa, M., Boland, M. 2011. Green kiwifruit modulates the cloninc microbiota in growing pigs. Letters in applied microbiology, 53: 379-385

- Havenaar, R., Huis IN'T., Veld, J.H.S. 1992. En: The lactic acid bacteria in health and disease. Vol. 1. B.J.B. Wood (Ed.), Elsevier, New York.

- Idoui, T., Boudjerda, J., Leghouchia, E., Karamb, N.E. 2009. Lactic acid bacteria from Sheep´s Dhan, a traditional butter from sheep´s milk:Isolation, identification and major technological traits. Grasas y Aceites, 60: 177-183.

- I.T.P. 1992. L'alimentation du parcelet. Institut Technique du Porc. Paris, Cedex. p. 56

- Macrogen, 2013. http://www.macrogen.com/. Accesado 15 de Diciembre de 2013.

- James, R.E., McGilliard, M.L., Hartman, D.A. 1984. Calf mortality in Virginia dairy herd improvements herds. Journal of DairyScience 67: 908-918.

- Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., Mercenier, A. 2010. Application of probiotic in food products - Challenges and new approaches. Current Opinion in Biotechnology, p.175-181.

- Jagnow, G., Wolfang, D. 1991. Introducción con experimentos modelo, EdZaragosa: Acribiap, 21: 157-167.

- Jehanno, D., Thuault, D., Bourgeois, C. M. 1992. Development of a Method for Detection of Lactic Acid Bacteria Producing Exclusively the L (+) Isomer of Lactic Acid. J Appl Environ Microbiol, 58: 4061-4067.

- Jones, D.M., Lessels, A.M., Eldridge,J. 1984. Campylobacter-like organisms on the gastric mucosa: culture, histological, and serological studies. J clin Pathol, 37: p.1002-1006.

- Judson, H.F. 1979. The Eighth Day of Creation. Makers of the Revolution in Biology. Simon and Schuster. ISBN0-671-22540-5.

- Jurado, H. G., Aguirre, D. F., Ramírez. C, T. 2009.Characterization of isolated probiotic bacteria of the large intestine of pigs as alternative to using antibiotics rev.mvz córdoba, 14: 1723-1735.

- Jurado, H. G., Ramírez. C, T., Martinez, J. 2013. In vivo evaluation of Lactobacillus plantarum as an alternative to antibiotics uses in piglets. rev. mvz córdoba, 18: 3648- 3657.

- Kirjavainen, P.V., Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Salminen, S.J. 1998. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. FEMS Microbiology Letters, 167: 185-189.

- Kleerebezem, M., Beerthuyzen, M.M., Vaughan, E.E., De vos, W.M., Kiuipers, O.P. 1997. Controlled gene expression systems for lactic acid bacterial Transferable nisin – inducible expression cassettes for Lactococcus, Leuconostoc and Lactobacillus ssp. Appli. Environ, Microbiol, 63: 4581.

- Kurzak, P., Ehrmann, M.A., Vogel, R. 1998. Diversity of lactic acid bacteria associated with ducks. Systematic AppliedMicrobiology, 21: 588-592.

- Ljungh, A., Wadstrom, T. 2009. *Lactobacillus* Molecular Biology. From Genomics to Probiotics. History of probiotics and living drugs. En Lactobacillus Molecular biology. From genomic to probiotic.

- Lilly, M., Stillwell, R. 1965. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. Science, 147: 747-748.

- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2004. Brock. Biología de los Microorganismos (10th ed. edición). Madrid: Pearson Educación S.A. ISBN 84-205-3679-2

- Marin, A., Rodríguez, A., Marrero, L., Manso, M.J., González, M. 2007. Estudio del efecto en lechones lactantes del probiotico de la biomasa proteica obtenida por la tecnología de cultivo de *Lactobacillus*y levaduras en miel “B”. Liv Res Rural Develop, 19: 195-196.

- Martens, S., Abello, J. 2009. A first screening of lab strains as inoculants for tropical legume silages. Proceedings of the XV th international silage conference ponencie.

- Marteau, P., Seksik, P., Jian, R. 2002. Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. British Journal of Nutrition, 88: 51-57.

- Maxwella, F.J., Duncanb, S.H., Holdc, G., Stewartb, C.S. 2004. Isolation, growth on prebiotics and probiotic potential of novel bifidobacteria from pigs. Anaerobe, 10: 33-39.

- Maré, L., Wolfaardt, G.M., Dicks, L.M. 2006. Adhesion of *Lactobacillus plantarum* 423 and *Lactobacillus salivarius* 241 to the intestinal tract of piglets, as recorded with fluorescent in situ hybridization (FISH), and production of plantaricin 423 by cells colonized to the ileum. J Applied Microbiol, 100: 838-845.

- Mattila-Sandholm, T., Blum, S., Collins, J.K., Crittenden, R., De Vos, W., Dunne, C., Fonden, R., Grenov, G., Isolauri, E., Kiely, B., Marteau, P. 1999. Probiotics: towards demonstrating efficacy. Trends Food Sci. Technol, 10: 393-399.

- McCray, S., 2003. Lactose intolerance: Considerations for the clinician. Practical Gastroenterology. Nutrition support in Gastroenterology, p. 21-39.

- Metchnikoff, E., 1907. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. En In: The prolongation of life: Optimistic studies. London.

- Miles, R. 2002. Porqué usamos antibióticos como promotores del crecimiento en primera instancia. Feeding Times, 7: 6.

- Muck, R.E., Holmes, B.J. 1999. Factors affecting bunker silos densites in the XII international silage conference Uppsala, sweeden, p. 278-279

- NCBI, 2014. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/. Accesado 22 de Marzo del 2014.

- NCBI, 2014. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=DNA/. Accesado 26 de Marzo del 2014.

- NCBI, 2014a. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Amplificacion de genes/. Accesado 26 de Marzo del 2014.

- NCBI, 2014b. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=PCR/. Accesado 26 de Marzo del 2014.

- NCBI, 2014c. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Molecular gel/. Accesado 26 de Marzo del 2014.

- NCBI, 2014d. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Bioinformatica/. Accesado 26 de Marzo del 2014.

- NCBI, 2014e. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Clonacio/. Accesado 26 de Marzo del 2014.

- NCBI, 2014f. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Estandarización/. Accesado 26 de Marzo del 2014.

- Ocampo, L. 2007. Alimentos de origen Animal Revista de Buenos Aires argentina, p. 56-75.

- Oyetayo, V.O., Oyetayo, F.L. 2005. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. Afr J Biotechnol. 4: 123-127.

- Park, J.W., Crowley, D.E. 2005. Normalization of soil DNA extraction for accurate quantification of target genes by real–timePCR and DGGE. Biotechniques, 38: 579-586.

- Pérez, N., Fajardo, P., Méndez, J., Cachaldora, P., Pastrana, C.L. 2006. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. Anim Feed Sci Technol, 134: 89-107.

- Pretzer, K.A., Ratkowsky, D.A., Ross, T. 2010. Modelling the growth rate of Escherichia coli as a function of pH and lactic acid concentration. Appl Environ Microbiol, 63: 2355-2360.

- Plevy, S. 2002. The immunology of inflammatory bowel disease. Gastroenterol. Clin North Am, 31: 77-92.

- Pieper, R., Janczyk, P., Urubschurov, V., Korn, U., Pieper, B., Souffrant, W.B. 2009. Effect of a single oral administration of *Lactobacillusplantarum*DSMZ 8862/8866 before and at the time point of weaning on intestinal microbial communities in piglets. Int J Food Microbiol, 130: 227-232.

- Pluske, J., Pethick, D. 2005. El impacto de la nutrición sobre desórdenes y enfermedades de tipo entérico en porcino. Australia: Murdoch University

- Pluske, J.R., Hampson, D.J., Williams, I. H. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review a Animal Science, Faculty of Agriculture, the university of western Australia, nedlands was

6907, Australia school of veterinary studies, Murdoch university, Murdoch was 6150, Australia

- Quigley, E.M.M. 2010. Prebiotics and probiotics; Modifyng and mining the microbiota. Pharmacological Research, 61: 213-218.

- Ramasamy, K., Abdullah, N., Wong, M., Karuthan, C., Wan Ho, Y. 2010. Bile salt desconjugation and cholesterol removal from media by Lactobacillus strains used as probiotics in chickens. J Sci Food Agric, 90: 65-69

- Raibaud, P. 1992. Bacterial interactions in the gut. En: Probiotics: Scientific Basis, R. Fuller Ed. Chapman & Hall, Londres, p. 9-28.

- RioPérez, J., RodríguezMembribe, M.L. 2000. Probióticos: Alternativa en la alimentación porcina. Rev Mundo Ganadero, p. 38-42.

- Rogosa, M., Mitchell, J.A., Wiseman, Y. 1951. A selective medium for the isolation of oral and faecal lactobacilli. J. Bacteriol, 62: 13

- Salminen, S., Nybom, S., Meriluoto, J., Collado, M.C., Vesterlund, S. 2010. Interaction of probiotics and pathogens - Benefits to human health Current Opinion in Biotechnology, p. 157-167.

- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., Lee, Y.K. 1999. Probiotics: how should they be defined? Trends Food Science e Technology, p. 107-110.

- Scholten, M. 2002. Orthographic input in L2 phonological development.' In Burmeister P, Piske T and Rohde A (eds) *An Integrated View of Language Development - Papers in Honour of Henning Wode.* Trier: Wissenschaftlicher Verlag Trier. p. 263–279.

- Scheppach, W. 1994. Effects of short fatty acids on gut morphology and function, 35: 35-38.

- Schrezenmeir, J., De Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics and symbiotics: approaching a definition. Am J Clinical Nutr, 73: 361-364.

- Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martínez-González, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., Kalantzopoukos, G., Tsakalidou, E., Mentis, A. 2004. In vitro and in vivo inhibition of Helicobacter pylori by Lactobacillus casei strain Shirota. Appl. Envirom. Microbiol, 70: 518-526.

- Song, Y.L., Kato, N., Liu, C.X., Matsumiya, Y., Kato, H., Watanabe, k. 2000. Rapid identification of 11 human intestinal Lactobacillus species by multiplex PCRassays using group – and species – specific primers derived from the 16S-23S rRNA intragenic spacer region and its flanking 23S Rrna. Fems Microbiology letters, 187: 167-173.

- Tamminen, K.A., Holt, N.L., Crocker, P.R.E. 2012. Adolescent athletes: Psychosocial challenges and clinical concerns. Current Opinion in Psychiatry, 25. doi: 10.1097/YCO.0b013e3283541248.

- Tanja, L., Agneta, L., Teemu, R., Sami, J., Ravi, k., Taija, E.P., Katri, L., Ingemar, V.O., Aguilar, G.S., Jakava, M., Palva, A. 2013. Effect of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 as feeding supplement on performance and immune function of piglets. http://dx.doi.org/ 10.1016/vetimm.2013.09.002.

- Taras, D., Vahjen, W., Simon, O. 2007. Probiotics in pigs - modulation of their intestinal distribution and of their impact on health and performance. Liv Sc, 108: 229-231.

- Tournut, J. 1994. Perspectives de veloppement des probiotiques a base de bacteries lactiques in: bacteries lactiques. Vol 11. lorica. pp 471-488.

- Tolpis, P., Tibble, S. 1995. Apetite management of the pig. Beyond diet formulation. En: *Proceedings of the 1995 Saskatchewan Pork Industry Symposium*, Saskatoon, Canadá, p. 23-33.

- Tuomola, E.M., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., Salminen, S.J. 2001. Qualityassurance criteria for probiotic bacteria. Am J Clin Nutr, 73: 393-398.

- Uchida, M., Murata, M. 2004. Isolation of a lactic acid bacterium and yeast consortium from a fermented material of Ulva spp. (Chlorophyta) Journal of Applied Microbiology, 97: 1297-1310.

- Uchida, M., Amakasu, H., Satoh, Y., Murata, M. 2004. Combinations of lactic acid bacteria and yeast suitable for preparation of marine silage FISHERIES SCIENCE, p. 507-517

- Vaughan, E.E., Hilig, H.G.H., Zoetendal, E.G., Satokari, R., Collins, J.K., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M. 1999. Molecular approaches to study probiotic bacteria. Trends in Food Science and Technology, 10:400-404.

- Vanhoutte, T., Preter, V.D., Brandt, E.D., Verbeke, K., Swings, J., Huys, G. 2006. Molecular monitoring of the fecal macrobiotic of healthy human subjects during administration of lactulose and Saccharomyces boulardii. Appl EnvironMicrobiol, 72: 5990-5997.

- Van Winsen, R.L., Urlings, B.A., Lipman, L.J.A., Snijders, D., Keuzenkamp, J.H.M., Verheijden, F.V. 2001. Effect of fermented feed on the microbial population of the gastrointestinal tracts of pigs. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3071-3076.

- Vesa, T.H., Marteau, P., Korpela, R. 2000. Lactose intolerance. J. Am. Coll. Nutr, 19: 165-175.

- Verdenelli, M.C., Ghelfi, F., Silvi, S., Orpianesi, C., Cecchini, C., Cresci, A. 2009. Probiotic properties of Lactobacillus rhamnosus and Lactobacillus paracasei isolated from human faeces. Eur J Nutr, 48: 355–363.

- Van den Abbeele, P., Grootaert, C., Possemiers, S., Vertraete, W., Verbeken, K., Van de Wiele, T. 2009. In vitro model to study the modulation of the mucin-adhered bacterial community. Appl Microbiol Biotechnol, 83: 349–359.

- Wang, X., Heazlewood, S.P., Krause, D.O., Florin, T.H. 2004. Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16s DNA sequence analysis. J. Appl. Microbiol, 95: 508-520.

- Wallgren, P., Melin., L. 2001. Weaning systems in the relation to disease, CABI publishin edition the weaner pig, Nottinggham uk, p. 309- 324.

- Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R. 2004. Molecular Biology of the Gene (Fifth edition edición). San Francisco: Benjamin Cummings. ISBN 0-321-22368-3.

- Walstra, P., Geurts, T.J., Normen, A., Jellema, A., Van Boekel, M.A.J.S .2001. Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. Editorial Acribia S.A. España, p. 730.

- Warren, I., Lee, E.M., Marin, H.K. 2007. Probiotics for preventing and treating Nosocomial Infections. Chest journal on line,http://www.chestjournal.org/content/132/1/286.full.html.

- Wells, J.M. 2011b. Inmunomodulatory mechanisms of Lactobacilli. Microb. Cell Fact. 10: 17.

- Williams, J.K.G *et al.* (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. In: Nucleic Acids Res. Bd. 18, S. 6531-6535.

- Yang, J., Cad, Y., Tereda, F. 2010. Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation J. Dairy Sci, 93: 3136-3145 doi: 10.3168/jds.2009-2898American Dairy Science association

- Yamamoto, K., Katayama, T. 2004. The Adhesion of Lactic Acid Bacteria to Intestine and Their Glycosidase. Foods Food Ingredients J. p. 209

- Yue, S., Rhee, R.M., Lonnie, O., Shanmugam, K.T. 2011. Physiological and fermentation properties of Bacillus coagulants and a mutant lacking fermentative lactate dehydrogenase activity JInMicrobialBiotechnology, 38: 441-450 DOI 10.1007/s10295-010-0788-4

- Ziemer, Ch.J., Gibson, G.R. 1998. An overview of probiotics, prebiotics and symbiotic in the functional food concepts: perspectives and future strategies. International Dairy Journal, 8: 473-479.

8 ANEXOS.

Anexo A. Preparación de medio de cultivo lactobacilli MRS Agar.

Composición del medio lactobacilli MRS Broth. REF. 7406 B	
Formula / Liter	Total
Enzymatic Digest of Animal Tissue	10 g
Beef Extract	10 g
Yeast Extract	5 g
Dextrose	20 g
Sodium Acetate	5 g
Polysorbate 80	1 g
Potassium Phosphate	2 g
Ammonium Citrate	2 g
Magnesium Sulfate	0.1 g
Manganese Sulfate	0.05g

1. Pesar 55 gramos de MRS Broth.

2. Pesar 15 gramos de Agar granulado. (Agente Solidificante)

3. Adicionar 1000 ml de agua destilada.

4. Colocar un magneto a la solución para incorporar el MRS y el agente solidificante y retire el magneto cuando la solución este homogénea.

Autoclavar.

5. Dejar reposar en la cámara de flujo laminar y proceder a servir el medio, en cajas Petri.

6. Dejar enfriar las cajas y almacenarlas a 4˚C.

Anexo B. Preparación de medio de cultivo Difco Rogosa SL Broth Agar

Composición de medio Rogosa Broth. REF. 247810

Approximate Formula* Per Liter	Total
Pancreatic Digest of casein	10.0g
Yeast Extr ct	5.0g
Dextrose	10.0g
Arabinose	5.0g
Saccharose	5.0g
Sodium Acetate	15.0g
Ammonium Citrate	2.0g
Monopotassium Phosphate	6.0g
Magnesium Sulfate	0.57g
Manganese Sulfate	0.12g
Ferrous Sulfate	0.03g
Polysorbate 80	1.0g

Pesar 59.7 gramos del polvo Rogosa.

Pesar 15 gramos de Agar granulado. (Agente Solidificante)

Adicionar 1000 ml de agua destilada.

Agregue 1.32 ml de ácido acético glacial.

Colocar un magneto a la solución para incorporar el polvo Rogosa y el agente solidificante y retire el magneto cuando la solución este homogénea.

Hervir durante unos 2 o 3 minutos no autoclavar.

Dejar reposar en la cámara de flujo laminar y proceder a servir el medio, en cajas Petri. Dejar enfriar las cajas y almacenarlas a 4˚C.

Anexo C. Protocolo de prueba de adhesión a mannosa

Alistar todo el material y limpiar la zona de trabajo.

Medir 10 ml de caldo de MRS en cada tubo, se lleva a autoclave y se agrega 50*ul* de cultivo de bacterias acido lácticas,y otra de *Saccharomyces cerevisiae* en 10ml de extracto de Mala, durante máximo 24 horas a una temperatura de 37°C. Para el cultivo de Saccharomyces cerevisiae, en 10 ml de extracto de malta agregamos 1 gramo de levadura, o 100 *ul* de levadura diluida.

Pasado 24 horas mezclar y centrifugar el cultivo como también la levadura, eliminar el sobrenadante y agregar medio tubo con buffer de fosfato (PBS) llevar a vortex, centrifugar nuevamente, votar el sobrenadante, y por último agregar 1 ml de (*PBS) (este lo utilizo para sembrar en cajas petri y para la microplaca*). Para la levadura pesar el tubo de centrifugación, el peso inicial con la muestra y se descarta el sobrenadante y se pesa solo la levadura que queda en el fondo, con este peso saco el 1% del total.

PI = 6.4711

PF = 6.7221

DIFERENCIA = 0.251

0.251 100%

X 1% x = 25 ml

*Para diluir la levadura, tengo que colocar 0.251*100 = 25 ml*

Procedimiento muestras en tubos eppendorf

Se toma 0.1 ml de la suspensión BAL en PBS y se adiciona 0.1 ml de PBS (1:2) eppendorf mediano $\log_2 = 1$

Se toma 0.1 ml de la suspensión BAL en PBS y se adiciona 0.3 ml de PBS (1:4) eppendorf mediano $\log_2 = 2$

Se toma 0.1 ml de la suspensión BAL en PBS y se adiciona 0.7 ml de PBS (1:8) eppendorf mediano

$log_2 = 3$

Se toma 0.1 ml de la suspensión BAL en PBS y se adiciona 1.5 ml de PBS (1:16) a los tubos eppendorf mediano $log_2 = 4$

Se toma 0.1 ml de la suspensión BAL en PBS y se adiciona 3.1 ml de PBS (1:32) eppendorf mediano $log_2 = 5$

Procedimiento en placa microliter

Primero se agrega *0.05 ul* de levadura a todos los pozos, excepto a los controles.

Se agrega 0.05 *ul* de BAL en cada pozo. Incluyendo los controles.

Se agrega 0.05 *ul* de *PBS* en un lado *y Methyl-α-D-mannopyranoside* en el otro lado.

Realiza controles de solo levadura, agregar PBS O *Methyl-α-D-mannopyranoside*.

Realizar la observación microscópica de cada pozo o cepa bacteriana, de los controles tanto de bacterias como de levadura.

Anexo D. Solución Ringer.

Preparación de solución Ringer

Nombre	Cantidad inicial/g	Cantidad total/g
Cloruro de sodio	8.6 *2	17.2
Cloruro de potasio	0.3*20.	0.6
Cloruro de calcio	0.33*2	0.66

Un balón volumétrico de 2000 ml agregar agua destilada hasta el aforo y se mezcla la solución.

Agregar las soluciones en frascos medibles.

Autoclavar.

Almacenar a temperatura ambiente

Anexo E. Protocolo de extracción de DNA de heces fecales.

Protocolo de extracción de DNA de heces fecales con kit "QIAamp® DNA Stool mini kit (50) REF. 51504"

En un tubo de microcentrifuga de 2.0 ml, pesar 180 – 220 mg de heces, si está en forma líquida pipete 200 µl esta muestra deben estar en hielo.

Añadir de la solución tampón ASL para cada muestra y Vortex por 1 minuto.

Calentar las muestras por 10 minutos a 70 ˚C en el baño maria.

Vortex durante 15 segundos, cada muestra se centrifuga a máxima velocidad (14000 rpm)

En un nuevo tubo de microcentrifuga de 2.0 ml, añadir 1.2 ml de sobrenadante y bote el sobrenadante.

Añadir una tableta de inhibitex a cada tubo de microcentrifuga y agitar inmediatamente y continuamente por 1 minuto, incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.

Centrifugar las muestras a máxima velocidad por 3 minutos.

En un nuevo tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, añadir todo el sobrenadante, descartar el sedimento y centrifugar la muestra por 3 minutos a máxima velocidad.

Pipetear 15 µl de proteinasa k en un nuevo tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.

Añadir 200 µl del sobrenadante del paso # 8 en el tubo de microcentrifuga que contiene la proteinasa k.

Añadir 200 µl de la solución de buffer AL y agitar por 15 segundos.

Incubar a 70 ˚C durante 10 minutos y centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto para eliminar residuos en la tapa.

Adicionar 200 µl de etanol a una concentración (96 – 100%) al lisado y mesclar con el Vortex, y centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto para eliminar residuos en la tapa.

Etiquetar la tapa de la mini columna QIAamp y el tubo de recolección, verter cuidadosamente el lisado del punto #13 a la columna de centrifugación sin humedecer las membranas, cerrar la tapa y centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto, colocar la columna de centrifugado en un nuevo tubo de recolección y desechar el que contiene el sobrenadante, cierre la tapa para evitar un efecto de aerosol y centrifugue de nuevo.

Destape cuidadosamente la columna de centrifugación y añada muy suavemente 500 µl de la solución de buffer AW1 cierre la tapa y centrifugue a máxima velocidad por 1 minuto colocar la columna de centrifugado en un nuevo tubo de recolección y desechar el que contiene el sobrenadante.

Habrá cuidadosamente la columna de centrifugación y adiciónele 500 µl de la solución de buffer AW2 cierre la tapa y centrifugue a máxima velocidad por 3 minutos.

Colocar la columna de centrifugado en un nuevo tubo de recolección y centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto en caso de que se encuentre buffer aun sin filtrar.

En un un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml debidamente etiquetado colocar la columna de centrifugación y adicionar cuidadosamente 100 µl de la solución de rehidratación AE directamente en la membrana y cierre la tapa de la columna y incubar por 1 minuto a temperatura ambiente, después centrifugar por 1 minuto a máxima velocidad para diluir el DNA, posteriormente almacenarlo a -20 ˚C.

Fuente: www.Quiagen.com

Anexo F. Protocolo de extracción de DNA de lactobacillus.

Protocolo de extracción de DNA de (*lactobacillus*) con kit " Wizard® Genomic DNA REF. A1120"

Agregar 1ml de cultivo bacterial a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.

Centrifugar a 14000 gravedades (12300 rpm) durante 2 minutos.

Descartar el sobrenadante.

Repetir el proceso de agregar 1 ml de cultivo de bacteria al tubo de microcentrifuga de 1.5ml.

Repetir los pasos 2, 3 hasta terminar el cultivo de bacteria.

Resuspender las células del cultivo obtenidas en los pasos anteriores en 480 µl de EDTA a una concentración de 50 mM.

Adicionar 120 µl de enzima lisozima a una concentración de 10 mg/ml y pipete con cuidado.

Incubar a 37 ˚C durante 60 minutos.

Centrifugar a 14000 gravedades durante 2 minutos y descartar el sobrenadante.

Adicionar 600 µl de la solución Nuclei Lysis Solution y pipete con cuidado.

Incubar a 80 ˚C por 10 minutos (Baño maria).

Agregar 1.5 µl de RNASE a una concentración de 10 mg/ml y mezclar por inversión.

Incubar a 37 ˚C por 60 minutos.

Adicionar 200 µl de la solución Protein Precipitation Solution.

Vortex a las muestras por 20 segundos.

Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.

Centrifugar a 14000 gravedades por 2 minutos.

Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifuga de e.5 debidamente marcado, adicionarle 600 µl de isopropanol frio.

Mezcle por inversión hasta ver los hilos del DNA en el tubo de microcentrifuga.

Centrifugar a 14000 gravedades por 2 minutos.

Descartar el sobrenadante y colocar el tubo de microcentrifuga sobre una servilleta invertido

para lograr extraer los residuos de isopropanol.

Adicionar al tubo de microcentrifuga 600 µl de etanol a una concentración del 70 % (Frio) e invertir el tubo para lavar el pellet, realizar este ejercicio por lo menos unas 2 veces más.

Centrifugar a 14000 gravedades por 2 minutos y descartar el etanol, además de colocar el tubo en una servilleta invertido.

Secar a temperatura ambiente o en un speebak sin temperatura.

Adicionar 100 µl de la solución DNA Rehydratation solution al pellet de DNA, incubar a 65 ˚C por 1 hora además de verificarlo cada 5 minutos o hasta que el pellet este disuelto en la solución.

Guardar los productos de DNA a -20 ˚C

Fuente: www.promega.com

Anexo G. Geles de agarosa.

Verificación técnica de electroforesis			
% agarosa	**Buffer TBE 0.5X**	**Agarosa g**	**µl de syber safe**
0.8	30 mL	0.24	1
1	200 mL	2.0	4
1.5	200 mL	3.0	4
1.8	200 mL	3.6	4

Anexo H. Protocolo pGEM® - Tand pGEM® - T Easy vector Systems.

Protocolo pGEM® - Tand pGEM® - T Easy vector Systems cat #A1360, A1380, A3600, AND A3610.

Clonación de fragmento de interés.

Ligación.

Etiquetar de manera correcta los tubos de microcentrifuga (0.2 mL)

Preparar el coctel pGEM® - T Easy:

Reactivos	Reacción
2X rapid ligtion buffer T4 AND ligase	5µL
pGEM® - Tand pGEM® - T Easy vector	1µL
Product PCR	Ajustar cantidades
Control insert	-
TDNA ligase (3 weiss units/mL)	1µL
Watter PCR	Si hay nesecidad
Total volumen	10µL

Al realizar el coctel, las muestras se incuban a 4°C por toda la noche.

Transformación.

1. Agregar hielo en un recipiente plástico.
2. Descongelar las células competentes DH5α en el recipiente que contiene el hielo.
3. Encender el baño maría y llevarlo a una temperatura de 42°C.

4. Atemperar medio LB a 25 °C.

5. Marcar las células competentes con la simbología de las muestras.

6. Colocar los tubos por 30 minutos en hielo.

7. Pasados los 30 minutos, colocar las muestras por 1 minuto a 42°C.

8. Colocar las muestras por 2 minutos en hielo.

9. Haciendo uso de una cabina de flujo laminar, agregar en un tubo de centrifuga de 15 mL agregar 1 mL del caldo LB a cada muestra.

10. Llevar las muestras a un shaker incubator a 37°C a 220 r.p.m, por una hora.

11. Pasado este tiempo atemperar las cajas Petri con medio LB agar

12. Centrifugar las muestras a 10000 r.p.m por un minuto.

13. Descartar el sobrenadante, dejando un poco de medio para poder pipetear muy suave sobre el pellet.

14. En una caja Petri la cual posee medio LB + Xgal + Ampicilina, se procede a sembrar la muestra en el medio, mediante el uso de un rastrillo de vidrio el cual esparce por toda la caja, sellarla con papel parafil.

15. Incubar a 37°C por ± 16 horas.

16. Retirar las cajas Petri de la incubadora y colocarlas a 4°C durante ± 20 minutos para parar el crecimiento de la placa y afirmar la coloración azul intenso.

17. Recortar las numeraciones del masterplate y fijarlo con unas cintas a las cajas Petri nuevas con medio LB.

18. Desarrollar la prueba de clonación en PCR.

Colony PCR Test.			
Go Taq Amplification			
1X rxn	Conct Inicial	Reactivos	100 X
4.85 µl	-	Agua ultra pura	485.00 µl
6.50 µl	2 X	go Taq® green master mix	650.00 µl
0.33 µl	10 pmol/µl	Primer Fwd	32.50 µl
0.33 µl	10 pmol/µl	Primer rev	32.50 µl
1.0 µl	5 ng	AND template	100.00 µl
13 µl	-	Vol total	1300.00 µl

Programa PCR RAPD's

stage 1	**stage 2**		**stage 3**
stape1 :95°C x 2 min	stape1 :94°C x 30 sec		stape1 :72°C x 5 min
-	stape2 :50°C x 1 min	35	Hold at 4°C
-	stape3 :72°C x 1 min	cycles	-

20. Posteriormente servir el coctel en una placa de 96 pozos en donde cada poso, con un palillo totalmente estéril se pica las colonias blancas en el plato de PCR, después cada palillo se pica en el plato petri masterplate teniendo muy en cuenta cual fue el repique de cada colonia para así mismo no tener confusión a la hora de correr el gel de verificación.

21. Colocar a crecer la placa del masterplate en una incubadora a 37°C por 24 horas.

22. Correr la placa de 96 pozos con las condiciones del programa anteriormente descritas.

23. Almacenar las cajas Petri a 4°C

24. Correr un gel de agarosa al 1.5%, con un voltaje de 130 por una hora y media.

25. Al determinar por la foto tomada del gel de agarosa, se procede a escoger según la numeración del masterplate, con una punta estéril de 100µl y en cabina de flujo laminar se pica la colonia y se procede a depositarla en un tubo de centrifuga de 15 mL el cual contiene 4 mL de caldo LB + ampicilina.

26. Colocar a crecer los tubos de centrifuga de 15 mL ya inoculados en shaker incubator 37°C a 220 r.p.m por 16 horas, almacenarlas a 4°C

Kit de extracción de ADN para Producto de Clonación "Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification system'' cat # A1460.

1. En tubo de microcentrifuga de 2 mL, adicionar con mucho cuidado el contenido de los tubos de centrifuga de 15 mL, pasadas las 16 horas de incubación en el shaker incubator 37°C a 220 r.p.m.Centrifugar a 10000g (12300 r.p.m) por 10 minutos.
2. Descartar el sobrenadante y repetir el ejercicio hasta terminar el contenido de los tubos de centrifuga de 15 mL.
3. Agregar 250 µl de la solución de resuspencion y pipetear muy suavemente.
4. Adicionar 250 µl de la solución de lysis y mezclar por inversión (No vortex) incubar de 1 – 5 minutos a temperatura ambiente.
5. NOTA. La solución alcalina no se utiliza puesto que inactiva las endonucleasas deteriorando el ADN.
6. Agregar 350 µl de la solución de neutralización e invertir por 4 minutos.
7. Centrifugar a máxima velocidad por 10 minutos.

Protocolo de purificación ADN del Plásmido.

1. Colocar una minicolumna debidamente etiquetada en un tubo de recogida.
2. Transferir el centrifugado a la minicolumna.
3. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto y descartar el sobrenadante, coloque de nuevo el tubo de recogida.
4. Adicionar 750 µl de la solución de lavado, previamente diluida con alcohol al 95%.
5. Centrifugar por 1 minuto a máxima velocidad.
6. Repetir el proceso pero con 250 µl de la solución de lavado.
7. Centrifugar a máxima velocidad por 2 minutos.
8. Transferir la minicolumna a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL.
9. Agregar 100 µl de agua ultra pura y centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto.
10. Almacenar el ADN del plásmido a -20 °C, para ser cuantificado.

Anexo I. Programa PCR convencional.

Programa PCR Convencional		
stage 1	stape1 :95°C x 2 min	1
	stape1 :94°C x 30 sec	35
stage 2	stape2 :53°C x 1 min	
	stape3 :72°C x 30 sec	
stage 3	stape1 :72°C x 5 min	1
	Hold at 4°C	

Anexo J. Kit de extracción de ADN a partir de Geles de Agarosa y/o producto de PCR

Kit de extracción y purificación de ADN a partir de Producto de PCR y/o Geles de agarosa "Wizard® SV Gel and PCR clean – up system, cat # A9280"

A partir de geles de agarosa.

1. Visualizar la banda de interés en el gel de agarosa a través de una cámara de luz uv.
2. Coger un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, pesarlo y registrar el peso, cortar el fragmento de interés del gel de agarosa y colocarlo en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, posteriormente pesarlo y registrar el peso para poder determinar cuánto pesa en realidad el fragmento.

   Nota: El fragmento cortado del gel de agarosa se puede almacenar por menos de una semana a -20˚C

3. Agregar la solución de membrana a razón de 10µl de la solución por cada 10 mg del peso del gel de agarosa contenido en los tubos de microcentrifuga.
4. Vortex al contenido por periodos cortos y agite el contenido hasta que se disuelva bien el gel en la solución, de nuevo Vortex, incube a temperatura ambiente mientras las partículas se depositan al final del tubo, a temperatura ambiente el gel no se solidificara.
5. Purificar el contenido del tubo mediante el uso de microcentrifuga y/o bomba de vacío.

Purificación del ADN a partir de Centrifugación.

1. Coger una minicolumna de SV etiquetarla y colocarla en un tubo de recogida.
2. Transferir el gel disuelto y/o producto de PCR a la minicolumna e incubarla por 1 minuto a temperatura ambiente.
3. Centrifugar la minicolumna a 16000 xg (12300 rpm) por 1 minuto, remueva la minicolumna del tubo de recogida y descarte el sobrenadante, coloque de nuevo la minicolumna en el tubo de recogida.

4. Adicionar 700µl de la solución de lavado de membrana, la cual previamente esta diluida en alcohol al 95% a la minicolumna, centrifugar por 1 minuto a 16000 xg (12300 rpm), retire con cuidado la columna del tubo de recogida sin que toque la solución descarte el sobrenadante y coloque de nuevo la minicolumna en el tubo de recogida, agregue 500µl de la solución de lavado de membrana y centrifugue por 5 minutos a 16000 xg (12300 rpm).
5. Descarte el sobrenadante, pero retirando con cuidado la columna del tubo de recogida sin que toque la solución, coloque la minicolumna en el tubo de recogida y centrifugue por 1 minuto a 16000 xg (12300 rpm) para eliminar cualquier presencia de solución.
6. Transferir la minicolumna a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, previamente marcado y con cuidado aplíquele sobre la membrana de la minicolumna 30µl de agua libre de RNASA sin tocar la membrana con la pipeta, incube a temperatura ambiente por 1 minuto y posteriormente centrifugue por 1 minuto a 16000 xg (12300 rpm).
7. Descarte la minicolumna y almacene el tubo que contiene el ADN total diluido a -20˚C.

   Fuente: www.promega.com