INSTITUTO TECNOLOGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

DIVISION DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
Y MARITIMAS

ESTUDIO SOBRE LA COMPETENCIA Y EL ANTAGONISMO QUIMICO DE LOS PRODUCTOS DE FERMENTACION DE *Lactobacillus acidophilus* EN CULTIVOS DE *Escherichia coli.*

TESIS

CARLOS LONGORIA RODRIGUEZ

1983

040.636
TEC.71
1983
c.2

INSTITUTO TECNOLOGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY
DIVISION DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y MARITIMAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

ESTUDIO SOBRE LA COMPETENCIA Y EL ANTAGONISMO QUIMICO DE LOS PRODUCTOS DE FERMENTACION DE *Lactobacillus acidophilus* EN CULTIVOS DE *Escherichia Coli*.

TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA
POR

CARLOS LONGORIA RODRIGUEZ

1983

A MIS PADRES

SR. ALFONSO LONGORIA SEGURA

SRA. MA. GPE. RODRIGUEZ DE L.

Con profundo agradecimiento por el apoyo, confianza y cariño que siempre me han brindado.

A MI HERMANO

ALFONSO

Por el cariño y respeto que nos une.

A MIS ABUELOS

ALFONSO LONGORIA BARRERO

Con cariño y respeto por el estímulo y espíritu de progreso que siempre me ha inculcado.

MA. TERESA SEGURA DE L. (Q.E.P.D.)

SANTIAGO RODRIGUEZ GCIA.

MINERVA GOMEZ DE RDZ.

Por el cariño y confianza brindados.

Con todo mi amor

A MI NOVIA

DIANA VERONICA

De quién siempre he recibido apoyo
y aliento para seguir adelante.

A MIS ASESORES

ING. ENRIQUE HERNANDEZ B.

ING. LYDIA GONZALEZ DE G.

Con el más sincero agradecimiento por los consejos y ayuda prestados para la realización de este trabajo.

A MIS MAESTROS Y COMPAÑEROS

I N D I C E

PAGINA

INTRODUCCION 1

LITERATURA REVISADA

Generalidades del género Lactobacillus ... 4

Especies de Lactobacillus 4

Descripción de Lactobacillus acidophilus . 7

Descripción de Escherichia coli 10

Complejo Escherichia-Aerobacter 12

Utilización de Lactobacillus acidophilus en ganado vacuno 13

Utilización de Lactobacillus acidophilus en ganado aviar 15

Utilización de Lactobacillus acidophilus en ganado porcino 16

Utilización de Lactobacillus acidophilus en el hombre 22

MATERIAL Y METODOS 24

RESULTADOS Y DISCUSION 38

CONCLUSIONES 47

RESUMEN 48

BIBLIOGRAFIA 50

APENDICE 55

INDICE DE TABLAS

TABLA No. PAGINA

1.- Fermentación de algunas especies de lactobacilos 10

2.- Conteo de lactobacilos y coliformes en heces de becerras alimentadas incrementalmente con productos de fermentación de lactobacilos. 15

3.- Lecturas del Ph intestinal en lechones suplementados con Lactobacillus spp. 17

4.- Efectos de la suplementación con lactobacilos en cerdos en crecimiento y engorda. 20

5.- Interpretación de el medio de cultivo Agar Eosina Azul de Metileno para aislamiento bacteriológico. 26

6.- Interpretación de el medio de cultivo Mac Conkey para aislamiento bacteriológico. 27

7.- Reacción Triple Azúcar Hierro en bacilos y cocobacilos Gram negativos (Fondo ácido, superficie alcalina, gas variable y no ácido sulfhídrico). 32

8.- Resultados de características observadas en pruebas de antagonismo químico y competencia entre cultivos de Lactobacillus acidophilus y Escherichia coli. 41

9.- Resumen de resultados de las características observadas en pruebas de antagonismo químico y competencia entre Lactobacillus acidophilus y Escherichia coli..... 42

10.- Presentación porcentual de las características mostradas por tres tratamientos para determinar la acción antagónica de Lactobacillus acidophilus contra Escherichia coli..... 43

11.- Diámetros de halo en discos indicadores bajo tratamiento con Productos de Fermentación de lactobacilos para determinar acción antimicrobiana sobre Escherichia coli..... 43

12.- Análisis de varianza para diámetros de halo en discos indicadores bajo tratamiento con Productos de Fermentación de lactobacilos para determinar uniformidad en acción antimicrobiana contra Escherichia coli..... 44

INDICE DE FIGURAS

FIGURA No. PAGINA

1.- *Lactobacillus acidophilus*. Tinción gram..... 7

2.- *Lactobacillus acidophilus* en cadena. Tinción gram..... 7

3.- Medias geométricas del conteo de *Lactobacillus* y coliformes en heces de 9 lechones control y 8 alimentados con *Lactobacillus lactis* concentrado..... 21

4.- Diagrama de Flujo experimental..... 37

5.- Fotografías mostrando la acción antimicrobiana de los Productos de Fermentación de *Lactobacillus acidophilus* contra *Escherichia coli* y la competencia entre ambas especies..... 46

I N T R O D U C C I O N

El tracto digestivo de los animales comprende de la boca al ano, estando cubierto por una mucosa compuesta por tejido epitelial muy delicado. Su temperatura es sobre los 36 grados centígrados, conteniendo un mecanismo de inmunidad y defensa con intervención de microorganismos.

El flujo continuo de alimento a través del tracto digestivo proporciona los nutrientes necesarios para llevar a cabo las funciones metabólicas básicas del organismo.

La asociación de microorganismos bacteriales benéficos y patógenos en este Hábitat tiene gran influencia en la regulación de la salud diaria del individuo. Los microorganismos compiten por un espacio en el tracto digestivo, siendo regulado su establecimiento por el Ph del medio, el cual es modificado por el estado general del individuo. Cuando el Ph se eleva a más de 1 favorece el desarrollo de las bacterias patógenas, si desciende, hay abundancia de bacterias benéficas.

La colonización de bacterias patógenas en el tracto digestivo se manifiesta por lo general con un estado febril, que puede traer como resultado final, el establecimiento de alguno de los dos grupos bacterianos y por consecuencia la muerte o salud del animal.

Existe otra microflora dentro del tracto digestivo, la cual deteriora lentamente al huesped, siendo detectada por Eli Metchnikoff, a la cual llamo "horrors auto-intoxicu". Como resultado de este descubrimiento Metchnikoff determinó que el continuo deterioro del huésped es causado por un cierto número de bacterias putrefactantes que habitan en el intestino.

El observó que grupos de ancianos búlgaros que tomaban grandes cantidades de leche fermentada alcanzaban edades más adultas que aquellos que no la consumían. El organismo que logró aislar de esta leche fué el Lactobacillus bulgaricus. Este investigador y otro número de científicos trataron inutilmente de implantar el L. bulgaricus en el intestino de los animales. Fue entonces cuando se volvió la atención hacia Lactobacillus acidophilus. Algúnos científicos han llegado a la conclusión de que L. acidophilus provee substancias antibacteriales, siendo usado por un gran número de médicos para combatir la destrucción de la flora intestinal, debida al continuo uso de antibióticos.

A través del uso contínuo y extensivo de antibióticos solos o combinados, a nivel subterapéutico, durante los últimos 15 años, se ha manifestado una tremenda población de gérmenes patógenos resistentes en algunos grupos de animales, y por lo tanto la efectividad de ningún antibiótico puede considerarse cuando la enfermedad se presenta.

Estos organismos son los llamados factor R y existen bien documentadas pruebas de laboratorio, que implican al organismo básico intestinal denominarlo Escherichia coli, el cual se ha convertido en hemolítico y muestra en muchos casos resistencia a todos los antibióticos (13,21,32,35).

En base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue el realizar un estudio sobre la competencia y el posible antagonismo químico existente entre Lactobacillus acidophilus y cepas aisladas de Escherichia coli, realizando para ello pruebas "in vitro" a nivel de laboratorio, para obtener resultados objetivos.

L I T E R A T U R A R E V I S A D A

Generalidades del género Lactobacillus .-

Esta palabra viene del latín lac que quiere decir leche, y bacillum, bastón o báculo, por lo tanto se trata de un organismo de la leche en forma de bastoncillo.

Se les da el nombre a las bacterias homofermentantes formadoras de ácido láctico que tienen forma de bastoncillo y cuyas temperaturas óptimas son de alrededor de 40 grados centígrados, de Thermobacterium, mientras que a aquéllas cuya temperatura optima es de 30 grados centigrados se les llama Streptobacterium. Los bastoncillos heterofermentantes recibieron el nombre de Betabacterium. Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum y Lactobacillus helveticus son lactobacilos típicamente heterofermentantes, que son de gran interés para el microbiólogo de la leche. Se encuentran lactobacilos en piensos, ensilaje, estiércol, y en la leche y sus productos. Su fermentación de los hidratos de carbono produce cantidades considerables de ácido (principalmente ácido láctico L (+) con indicios de ácido láctico D (-)) y como estos organismos no mueren fácilmente por la acción del ácido, se les llama acidúricos. (10).

Especies de Lactobacillus.-

a) Lactobacillus acidophilus: Está ampliamente distribuido y se encuentra en la leche y productos lácteos,

siendo un comensal del tracto digestivo de los animales. Se utiliza para hacer la leche acidificada y se supone está relacionado con la caries dental del hombre, en la que puede estar descrito como Lactobacillus odontolyticus. L. acidophillus es posiblemente el germen descrito como bacilo de Boast-Oppler, observado en casos de carcinoma del estómago en el hombre y también el bacilo de Doderlein, hallado en la vagina humana. (30).

b) Lactobacillus bulgaricus: Está asociado también con la leche y productos lácteos, pero es termófilo y no se encuentra en el intestino de los mamíferos. Se emplea en la fabricación del yoghurt, en la crema de queso y para producir burbujas de gas en los quesos duros. Se debe en parte a este germen la fermentación natural del ensilaje. Las colonias en los medios de agar son pequeñas y grises. (10,30).

c) Lactobacillus casei y Lactobacillus plantarum: Son difíciles de separar, excepto por cromatografía en papel de los productos finales de la fermentación de los carbohidratos. L. casei se utiliza para la elaboración del suero y se encuentra naturalmente en la leche y en el queso. L. plantarum está ampliamente distribuido sobre las plantas, vivas y muertas, siendo uno de los gérmenes responsables de la fermentación de encurtidos y procesamiento de carnes y pescados curados con sal. (10,11,30).

d)Lactobacillus thermophilus: Cuya categoría taxonómica está puesta en tela de juicio, se aisla de la leche pasteurizada, mostrando ser termófilo (temperatura óptima por encima de 50 G.C.) pudiendo causar dificultades en la obtención de una disminución satisfactoria del número de bacterias durante la pasteurización de la leche por el método de tina (lento). (10).

e)Lactobacillus helveticus: Es un microorganismo que puede proliferar a temperaturas tan elevadas como 48 G.C. y ha sido utilizado en cultivos iniciadores durante la fabricación de queso suizo, al igual que L. lactis. (10,11).

f)Lactobacillus delbruckii: Se encuentra en la vegetación y en granos, utilizandose como un iniciador de Ph ácido, del medio donde se desarrollan las levaduras de fermentación en los granos. Este germen crece en medios de agar dando colonias pequeñas de bordes dentados. (30).

Existen a su vez otras especies de lactobacilos, tales como Lactobacillus brevis , causante de las manchas de la herrumbre del queso cheddar, L. leichmanii, que se encuentra en la mayor parte de los productos lácteos, Lactobacillus buchneri y L. fermenti que son heterofermentantes, etc. (10,11,30).

Lactobacillus bulgaricus y Lactobacillus acidophilus son difíciles de distinguir prontamente uno de otro. En los últimos años (10) se sugirieron las siguientes

características diferenciales entre si : Lactobacillus acidophilus proliferará en presencia de sales biliares o de sal al 2 por ciento, pero no al 4 por ciento mientras que Lactobacillus bulgaricus no proliferará en presencia de sales biliares ni de sal al 2 por ciento. Por lo general, L. bulgaricus produce en cultivos en base a leche, más ácido del que produce Lactobacillus acidophilus.

Descripción de Lactobacillus acidophilus.-

I Taxonomía:

Orden: Eubacteriales

Familia: Latobacillaceae

Tribu: Lactobacilleae

Género: Lactobacillus

Especie: acidophilus

Tipos: X o R cuando hay colonias rugosas
Y o Z cuando hay colonias lisas

FIGURA 1. L. acidophilus. Tinción gram.

II Características celulares:

Morfología: Forma bacilar con puntas redondeadas

Motilidad: Nula

Coloración: Gram positivo

Ocurrencia: Solo, en pares o en pequeñas cadenas

Tamaño: 0.6 a 0.9 X 1.5 a 6 micras

FIGURA 2. L. acidophilus en cadena. Tinción gram.

Hábitat: Producteos lácteos.

III Características de cultivo:

Wort agar o agar tomate.- Colonias superficiales largas.

Wort agar slant.- Crecimiento escaso, seco.

Wort broth.- Sedimentos finos después de 48 horas.

Gelatina.- Crecimiento nulo a 20 G.C.

IV Características fisiológicas:

A) Acción bioquímica:

a)Leche.- Coagulación sobre el fondo.

b)Azúcares.- Formación de ácido láctico y ácidos orgánicos.

B) Licuefacción de proteinas:

Gelatina.- Nula liquefacción.

C) Reacciones de fermentación:

a) Monosacaridos.-

Arabinosa:	Fermentación nula.
Ramnosa:	Fermentación nula.
Xilosa:	Fermentación nula.
Glucosa:	Acida, no formación de gas.
Fructuosa:	Acida.
Manosa:	Acida.

b) Disacaridos.-

Lactosa:	Acida.
Sucrosa:	Acida, no formación de gas.
Maltosa:	Acida.
Trealosa:	Variable.

c) Polisacaridos.-

Rafinosa: Variable.

Dextrina: Variable.

d) Polialcoholes.-

Glicerol: Fermentación nula.

Sorbitol: Fermentación nula.

Manitol: Fermentación nula.

Dulcitol: Fermentación nula.

Inositol: Fermentación nula.

D) Factores de crecimiento:

Oxígeno.- Microaerófilo.

Temperatura.- Optima= 37 G.C.

Máxima= 43 a 48 G.C.

Mínima= 20 a 22 G.C.

Nutrición.- En un medio carente de carbohidratos no crecen.

Ph.- Desarrollo en medio ácido.

V Utilización industrial:

En procesos de leche ácida y fabricación de quesos.

VI Utilización médica:

Terapia en diversos disturbios gastrointestinales.

VII Patogenicidad:

Animales.- No existe patogenicidad en animales.

Se han establecido diferencias en la fermentación por las que se pueden establecer diversas especies de lactobacilos, mostradas y clasificadas en la tabla 1 (30).

TABLA 1. Fermentación de algunas especies de lactobacilos

	15G.C.	45G.C.	Lac.	Sac.	Sal.	Man.	Sor.	Xil.	NH3
a	-	+	A	A	A	-	-	-	-
b	-	+	A	-	-	-	-	-	-
c	+	-	v	v	A	A	A	-	-
d	+	v	A	A	A	A	-	-	-
e	-	+	-	A	-	-	-	-	-
f	-	+	v	A	+	-	-	-	-
g	+	-	v	A	v	v	-	A	+
h	-	+	A	v	-	-	-	v	+

A:Producción de ácido en medio de carbohidratos.
v:Variable.
a:(Lactobacillus acidophilus). b:(L. bulgaricus).
c:(Lactobacillus casei). d:(L. plantarum).
e:(Lactobacillus delbruckii). f:(L. leichmanii).
g:(Lactobacillus brevis). h:(L. fermenti).
Lac = Lactosa. Sac = Sacarosa.
Sal = Salicina. Man = Manitol.
Sor = Sorbitol. Xil = Xilosa.

Descripción de Escherichia coli.-

La bacteria E. coli fué descubierta por Theobald Escherich (1855), al estar examinando heces de niños recién nacidos, encontrando que cierta bacteria aparecía en estas, en concomitancia con el alimento de pecho. El llamó a esta bacteria "Bacterium coli comune" que actualmente se denomina Escherichia coli, (33).

Este microorganismo es un habitante del tracto digestivo. Es un bacilo de 2-3 micras de longitud, gram negativo, el cual crece en medios comunes de laboratorios y

no forma esporas. Desarrolla colonias características con centros negruscos en Agar de Eosina de Azul de Metileno (EMB); es positivo a la prueba Indol y a la de Rojo de Metilo (MR); es negativo a la prueba de Voeges-Proskauer (VP), al Citrato de Simmons, al Sulfuro de hidrógeno, a la Ureasa y al Cianuro de potacio. Puede ser mótil o no mótil, fermenta lactosa, no asi el adonitol o inositol.(8).

Por medio de técnicas serológicas, ha sido posible determinar tres clases de antígenos de E. coli: el somático (O), el capsular (K) y el flagelar (H). Cada uno de estos tipos está subdividido dentro de grupos antigénicos designados por números que se asignan conforme se van encontrando nuevos grupos (8,25). De acuerdo con esto se han encontrado cepas enteropatógenas (EPEC) y no enteropatógenas (NEPEC); las primeras producen acumulación de fluido en el lumen infectado, mientras que las últimas no presentan semejante acción. (25).

Se han determinado grupos serológicos de Escherichia coli asociados a la colibacilosis entérica en diferentes especies; por ejemplo los asociados comunmente con diarrea colibacilar (34), particularmente diarrea neonatal en cerdos, siendo estos los siguientes:

"G7"	08:K88A.B(L)
"G205"	08:K87(B)88A.B.C(L)
"G4 - 66"	045A.C:K"E65".K88.C(L)
"G491"	0138:K81(B).K88A.B(L)
"E681"	0141:K85A.B(B).K88A.B(L)

"G1253"	0147:K89(B).K88A.C(L)
"A1"	0149:K91(B).K88A.C(L)
"A2"	0157:K"V17".K88A.C(L)

La E. coli enteropatógena no invade las células epiteliales sino que se adhiere a la mucosa superficial del intestino. Se ha demostrado que el antígeno K88 es el que causa la adherencia tanto "in vivo" como "in vitro". (8,17,25).

Se reconocen dos tipos de enterotoxinas de carácter proteico: "ST" termo estable producida por todas las cepas enteropatógenas de E.coli "LT" termo lábil. (17,34,37).

Gyles citado por Sojka (34) menciona que la mayoría de las cepas de E. coli, especialmente aquellas aisladas en casos de diarrea neonatal, producen tanto la enterotoxina ST como LT. La enterotoxina LT es inmunogénica y puede neutralizarse con antisuero preparado de la enterotoxina LT (lisado de E. coli). mientras que la ST no es inmunogénica.

Complejo Escherichia - Aerobacter.-

Escherichia coli y Aerobacter aerogenes son dos de los miembros más importantes del grupo coliforme. Además de las características generales de cada uno, puede hacerse notar que Escherichia coli está, por lo general, dotado de movimiento, mientras que, por lo general, Aerobacter aerogenes es inmóvil. Estos géneros proliferan bien en agar

nutritivo y las placas que contienen sus colonias poseen un olor característico. Su temperatura óptima es de 37 G.C. y la escala de la misma va de 2.5 a 45 G.C.(10).

La diferenciación entre Escherichia coli y Aerobacter aerogenes se establece a base de una serie de pruebas fisiológicas llamadas reacciones IMViC. Estas letras representan respectivamente pruebas de producción de Indol; con Rojo de Metilo; de Voges- Proskauer,y la utilización de Citratos. Por lo general E.coli es positivo respecto a las dos primeras pruebas y negativo en cuanto a las últimas, mientras que A.aerogenes ocurre a la inversa comunmente.(10).

Utilización de Lactobacillus acidophilus en ganado vacuno.-

Becerros jóvenes fueron alimentados con leche pasteurizada mezclada con L.acidophilus y mostraron, según Gilligand (12), un aumento de los mismos en la flora intestinal así como una reducción de la población de coliformes en comparación con el control.

Bechman (2) encontró que becerras Holstein alimentadas desde los 4 días con un reemplazador de leche más Lactobacillus acidophilus o bien leche baja en grasa más L. acidophilus observaron un incremento promedio de peso diario en un período de 42 días de 0.27 kg. en comparación con 0.23 kg. del control, aunado esto a una reducción en la incidencia de diarreas.

En un experimento de 28 días con becerras Holstein y Ayrshire alimentadas con 90.7 kg. de reemplazo de leche más 9.10 kg. y 10.9 Kg. de calostro con adición de Lactobacillus acidophilus, Hatch (16) observó una reducción muy marcada en la incidencia de diarreas, aunque los animales control tuvieron ganancias mayores de peso en comparación al tratamiento con lactobacilos.

Por otro lado Davis (5) en un experimento semejante encontró que becerras alimentadas con un reemplazador de leche y L. acidophilus aumentaron 6.82 kg. en las 2 semanas post-destete , mientras que las del control aumentaron solo 5.82 kg.

Un miembro del personal docente de Cirugía y Medicina de Kansas State University (3) efectuó un proyecto de investigación para evaluar la añadidura de Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Torulopis spp. y Aspergillus oryzae a la leche de los becerros y encontró que los animales tratados tuvieron aumentos mayores que el testigo y menor incidencia de diarreas.

C. G. Schwab y colaboradores (31) realizaron varios experimentos para determinar los cambios en la flora fecal de becerras alimentadas con productos de fermentación de Lactobacillus bulgaricus no viables y obtuvieron, entre otros, los resultados expuestos en la tabla 2.

TABLA 2. Conteo de lactobacilos y coliformes (log 10/gr) en heces de becerras alimentadas incrementalmente con productos de fermentación de lactobacilos (PFL).

Días de prueba	ml/día de PFL				
	lactobacilos				
	0	3	6	12	24
0	8.35	8.38	8.39	9.11	8.67
1	8.57	8.90	9.05	9.59	9.06
2	9.10	9.02	8.84	8.95	8.84
3	8.73	9.35	8.20	9.49	9.52
	coliformes				
0	8.85	8.82	8.58	8.48	8.51
1	8.44	8.66	8.00	8.24	8.71
2	8.33	8.04	7.67	8.13	8.21
3	8.04	7.89	7.88	7.96	7.83

Utilización de Lactobacillus acidophilus en ganado aviar.-

Andrew Sthal (35), administrador de gallinas ponedoras de la colonia Rosendale, en Dakota del sur, realizó un experimento con 10 parvadas de gallinas Shaver criadas desde

su nacimiento, abarcando todo su ciclo de producción, consistiendo éste, en la suplementación de las aves con un producto comercial elaborado a base de Lactobacillus spp. durante todo el ciclo. Los resultados de este experimento fueron los siguientes:

a) El número de promedio de días de producción fué el mismo en las 10 parvadas (10,000 aves / parvada). b) El promedio de huevos producidos por ave suplementada fué de 10.6 más unidades, o sea, 3.9 por ciento más huevos por ave. c) El número total de docenas de huevos producidas por las parvadas suplementadas fué de 16,311 más que las aves de control, o sea un 7.2 por ciento de aumento. d) Las parvadas suplementadas consumieron 7.4 por ciento menos de alimento para producir 7.2 por ciento más de huevos, lo que equivale a una economía de 0.29 libras (.13 gr.) de alimento por cada docena de huevos producidos. e) La mortandad fué de 1.88 por ciento mayor en las aves suplementadas que en las aves control

Utilización de Lactobacillus acidophilus en ganado porcino.-

En la Universidad de Kansas, el Dr. Keith Beeman y el Dr. John W. Thovenille (4), realizaron un experimento para observar los cambios en el Ph de diferentes secciones intestinales, en lechones recién nacidos, los cuales fueron suplementados con una pasta comercial, compuesta de Lactobacillus spp. Se sacrificaron los cerdos por

electrocución y se identificó cada sección del intestino, tomando a su vez lecturas del Ph existente con un medidor digital, esto aunado a un exámen para determinar si existía en los cerdos tanto experimentales como de control, la presencia de bacterias Escherichia coli que mostraran toxinas lábiles al calor y estables al calor. Los resultados se muestran en la tabla 3 y comentarios subsecuentes.

TABLA 3. Lecturas del Ph intestinal en lechones suplementados con Lactobacillus spp.

	Control	Experimento	Diferencia
Duodeno	4.96	4.93	0.03
Yeyuno	5.80	5.39	0.41
Ileon	6.06	5.77	0.29
Colon	6.11	5.72	0.39

Los resultados de esta investigación fueron los siguientes:
a) Se redujo notablemente el Ph en el Yeyuno, Ileon y Colon.
b) Todas las áreas del intestino fueron cultivadas y se recuperó el lactobacilo en todos los animales del tratamiento experimental, no obstante, algunos de los animales de control no mostraron presencia de lactobacilos.
c) De los animales del experimento un 33 por ciento tenían E. coli, que produjo toxina lábil al calor (suplementados).
d) El 66 por ciento de los animales de control tenía E. coli, que produjo toxina lábil al calor.

Porter (et al) citados por Pollmann (27) han encontrado que los lactobacilos inhiben los coliformes hemolíticos, los cuales son parte integral de las diarreas.

Muralidhara y colaboradores (23) efectuaron un estudio para determinar el efecto de la alimentación con concentrados de lactobacilos sobre la colonización de Escherichia coli en el intestino de lechones. Para llevar a cabo dicho estudio, dividieron el intestino en 9 secciones, las cuales fueron congeladas para su posterior análisis microscópico y serológico. En el caso de los lechones que presentaron diarrea, se encontró que la E. coli se encontraba distribuida en las vellocidades y superficie de células epiteliales de las primeras 6 secciones y dicha bacteria, era serológicamente igual en los animales tratados y de control. En los lechones tratados se encontró una gran cantidad de bacterias gram positivas, las cuales estaban adheridas a la superficie del epitelio y distribuidas en las vellosidades de la primer sección intestinal. No se encontró E. coli en las tres primeras secciones del intestino de los animales tratados; los lactobacilos colectados fueron serológicamente idénticos a los suplementados.

Utilizando lechones provenientes de 22 camadas, Perez determinó (26) que en lechones suplementados con lactobacilos, se redujo la incidencia de diarreas y que dicho método puede ser utilizado como terapéutico en el caso de diarreas leves; a su vez encontró que no hubo diferencia

significativa en aumentos de peso, pero sí en la tasa de mortalidad, siendo esta más baja en los lechones tratados. La mayor incidencia de diarreas fué entre 9 y 18 días de nacidos.

Un gramo por día de Lactobacillus acidophilus liofilizados, en 5 ml de leche esterilizada, administraron Redmond y Moore, citados por Dunne (8), a lechones de doce horas de nacidos, por vía oral, encontrando que es un método efectivo en la prevención de diarreas.

Poolmann (28) encontró que al administrar 10 ml de inóculo de Lactobacillus acidophilus (2 x 10*11 células viables /ml) aislados de la leche, aumentaba la flora en la región cárdica, de lactobacilos y coliformes, sin presentarse evidencias de diarrea.

En otro reporte experimental de Poolmann y colaboradores sobre el uso de lactobacilos (27) menciona que algunos investigadores han reportado que la administración de éstos, suprime el crecimiento de la bacteria Escherichia coli.

Las bacterias productoras de ácido láctico, tales como Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus faecium han sido estudiadas por Michell y Kenworthy (19), encontrando que éstas inhiben el crecimiento de Escherichia coli en agar, por lo que utilizaron caldos conteniendo fermentos de L. bulgaricus en dietas de cerdos destetados precozmente, dando en evidencia una acción anti-toxina que fué muy benéfica para los lechones suplementados.

Hale y Newton (13) realizaron varios experimentos con la finalidad de observar la incidencia e intensidad de diarreas, así como el comportamiento de cerdos, al utilizar productos de fermentación de especies de lactobacilos no viables (PFL). Administraron varios niveles de dichos productos de fermentación y concluyeron que, en todos los niveles de PFL la incidencia de diarreas fué menor ($p < 0.05$), pero que los niveles más eficientes fueron de 0.36 y 0.72 ml / kg de alimento, observando a su vez una mejor eficiencia alimenticia.

En cerdos en crecimiento y engorda, se han hecho experimentos con suplementos alimenticios a base de lactobacilos, para determinar su efecto en los aumentos de peso y la eficiencia alimenticia. Tal es el experimento realizado por Engnell (9), en la Universidad de Illinois. Los resultados se muestran en la tabla 4 y posteriores comentarios.

TABLA 4. Efectos de la suplementación con lactobacilos en cerdos en crecimiento y engorda.

	Sup A	Sup B
No. de cabezas	29	29
Peso promedio		
Inicial(lb)	42.7 (19.37Kg)	42.7 (19.37Kg)
Final(lb)	219.60 (99.61Kg)	229.30 (104.00Kg)

Sup A = Sin lactobacilos.
Sup B = Con lactobacilos.

Para resumir los datos de esta tabla brevemente; los cerdos experimentales (B) mostraron un 5 por ciento de aumento adicional de peso, un 4 por ciento de mejor eficiencia de alimentación y un 4.6 por ciento de aumento de peso diario promedio superior a los cerdos de control (A) durante este experimento que tuvo una duración de 123 días en los períodos de crecimiento y engorda.

En una investigación hecha por Ollson, citado por Hale y Newton (13). alimentando con 50 gr. de Lactobacillus acidophilus liofilizados diariamente por 10 días a lechones, encontró que la enteritis desaparecía y los pesos se incrementaban en un 25 a 40 por ciento.

Muralidhara y colaboradores (21,22,23,24), han hecho un sin número de investigaciones acerca de Lactobacillus spp., entre ellos un estudio sobre el efecto de la administración de lactobacilos en la flora de Lactobacillus y coliformes en el epitelio intestinal y heces de lechones, en el cual suministraron diferentes niveles de Lactobacillus lactis concentrado. Los resultados pueden ser apreciados en la figura 3. (24).

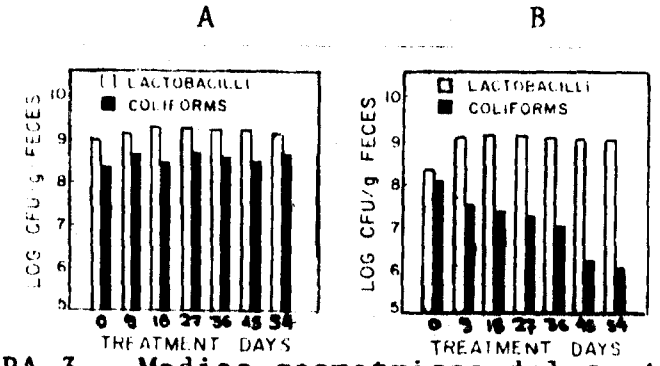

FIGURA 3. Medias geometricas del conteo de Lactobacillus y coliformes en heces de 9 lechones control (A) y 8 alimentados con L. lactis concentrado (B).

En otro experimento realizado para determinar los efectos de utilizar concentrados de células viables de lactobacilos como alimento sobre la microflora del intestino, los lechones de cada camada fueron divididos en 2 grupos: el control, alimentado normalmente y los cerdos tratados, a los que se les administró un concentrado de lactobacilos oralmente. En los cerdos tratados la relación lactobacilos : coliformes fué de 1040:1 , en comparación con el testigo 4.7:1 , lo cuál incidió en la salud de los lechones, variando el porcentaje de 2.9 a 22.0 de coliformes en control y testigo. (22)

Muralidhara también estudió el desarrollo de Lactobacillus spp. fecales y bacterias coliformes en cerdos recién nacidos durante las primeras 48 horas y encontró que a las 4 horas después del nacimiento los lactobacilos eran del orden de 10*4 por gramo de heces, y los coliformes a las 8 horas de 10*8 a 10*9 por gramo. (21).

Takeuchi y Savage (36) reportan que los lactobacilos solo pueden establecerce en la mucosa del epitelio gástrico, y sugieren que esto es debido a un ácido mucopolisacárido que es producido por la bacteria.

Utilización de Lactobacillus acidophilus en el hombre.-

Lactobacillus acidophilus se encuentra en gran número en el contenido intestinal del lactante humano, pero se ve suplantado por otros organismos cuando el niño recibe una dieta variada. Hace algunas décadas se supo que L.

acidophilus puede establecerse en el intestino del adulto y que las personas que padecen de estreñimiento, diarreas y ciertos trastornos del tubo digestivo pueden a menudo beneficiarse con tal hecho. (10).

Lactobacillus acidophilus es una bacteria intestinal típica, y puede implantarse en el tracto intestinal del hombre (10,15,30).

M A T E R I A L Y M E T O D O S

El presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Diagnóstico de Patología Animal, localizado en terrenos de la Exposición Ganadera, en el Municipio de Guadalupe Nuevo Leon, en el período agosto - noviembre de 1982.

Para la elaboración de este trabajo se utilizaron 30 cajas Petri, las cuales fueron distribuidas en los tres tratamientos siguientes (10 cajas por tratamiento):

T1 :

Tres discos sensibles, impregnados de el sobrenadante de un cultivo de Lactobacillus acidophilus en leche en polvo reconstituída con agua destilada, colocados sobre una placa de medio de Triptosa agar sembrada con Escherichia coli por estría.

T2 :

Tres discos sensibles, impregnados de el sobrenadante de un cultivo de Lactobacillus acidophilus en leche en polvo reconstituída con agua destilada,muertos por ebullición, colocados en un cultivo de Escherichia coli, sembrada en estrías sobre la superficie de un medio de Triptosa agar.

T3 :

Tratamiento testigo, consistente en 3 discos sensibles impregnados de agua destilada, colocados sobre un cultivo de Escherichia coli, sembrada en un medio de Triptosa agar.

El medio Triptosa agar es un medio utilizado como substrato de prueba para la detección de Catalasa y la identificación de especies de Haemophilus.

El procedimiento detallado de este experimento se describe en los siguientes puntos.

I.- Se tomaron muestras de cultivos realizados por el Laboratorio, en heces y víceras de diferentes especies animales (aves,porcinos etc), para aislar colonias de la bacteria Escherichia coli, inoculándose en caja Petri, sobre los siguientes medios :

a) Agar EMB (Agar Eosina-Azul de Metileno-Lactosa-Sacarosa).
b) Agar Mac Conkey.

Composición química del Agar EMB :

Peptona de caseína	10.0
Lactosa	5.0
Sacarosa	5.0
Hidrogenofosfato dipotásico	2.0
Eosina amarillenta	0.4
Azul de metileno	0.065
Agar-agar	13.5

(cantidades en gr/litro)

En la tabla 5 se muestra la interpretación (18).

TABLA 5. Interpretación de el medio de cultivo EMB para aislamiento bacteriológico

Colonias	Microorganismos
Transparentes, ambarinas	*Salmonella*
	Shigella
Brillo metálico, centro negro azulado	*Escherichia coli*
Mucosas confluyentes, centro pardo grisáceo	*Enterobacter*
	Klebsiella

Composición química del Agar Mac Conkey :

Peptona de caseína	17.0
Peptona de carne	3.0
Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Cloruro sódico	5.0
Rojo neutro	0.03
Violeta cristal	0.0001

(cantidades en gr/litro)

36 gramos del producto se dejan remojar durante 15 minutos en 1 litro de agua destilada, se hierve hasta solución completa, se esteriliza, se enfria y se vierte.

En la tabla 6 se muestra la interpretación de dicho medio. (18).

TABLA 6. Interpretación del medio de cultivo Mac Conkey para aislamiento bacteriológico.

Colonias	Microorganismos
Incoloras, transperentes	Salmonella, Shigella
Grandes, rojas, con halo turbio	Escherichia coli
Grandes, rosas, mucosas	Enterobacter Shigella
Diminutas, esporádicas, opacas	Enterococos Estreptococos

Las colonias lactosa negativas son incoloras; las lactosa positivas son rojo violeta con un halo turbio, debido a la disminución del valor del Ph de los ácidos biliares(18).

II.- Teniendo tentativamente identificadas e aisladas las colonias de Escherichia coli, se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas de corroboración :

a) Medio de TSI (Triple Azúcar Hierro).
b) Citrato de Simmons, agar.
c) Medio de SIM (Acido Sulfhídrico, Indol y movilidad).
d) Prueba de Kovacs (Detección de Indol).

A) Descripción del medio de TSI (Triple Azúcar Hierro).-
Utilizado para la identificación presuntiva de los microorganismos Gram negativos.

Reacción:

Rojo-naranja-Tubo sin inocular (control).

Amarillo (ácido) = No fermentación de glucosa, sucrosa o lactosa.

Negro en el fondo = Producción de A.sulfhídrico.

Burbujas en fondo = Organismo aerobio.

Interpretación:

1	Fondo ácido Superficie ácida Gas en el fondo	Fermentación de glucosa,sucrosa lactosa con formación de ácido y gas.
2	Fondo ácido Superficie alcalina Variable en gas Color negro en fondo	Fermentación de glucosa, con la formación de ácido y variable en gas. Sucrosa y lactosa no fermentadas.No pdcción. de H_2S.
3	Fondo ácido Superficie alcalina Variable en gas Sin color negro	Fermentación de glucosa, con la formación de gas. Fermentación nula en sucrosa y lactosa. No producción de H_2S.
4	Fondo ácido Superficie ácida Variable en gas Color negro	Fermentación de glucosa,sucrosa lactosa con formación de ácido y variable en gas. Producción de H_2S.

5	Fondo alcalino Superficie alcalina No gas Sin color negro	No fermentación de glucosa, sucrosa o lactosa. No producción de gas. No producción de ácido sulfhídrico.
6	Fondo ácido Superficie ácida No gas Variable color negro	Fermentación de glucosa, sucrosa lactosa, con formación solamente de ácido. No gas. Variable en producción de ácido sulfhídrico

Los tubos con Triple Azúcar Hierro deben ser examinados a las 24 horas. Si se prolonga el período de incubación las reacciones ácidas pueden revertir a alcalinas (debido a la terminación de los carbohidratos fermentables con el subsecuente ataque de las peptonas a partir de las cuales substancias alcalinas son producidas (amoníaco etc.)). La pequeña cantidad de ácido producido de la glucosa es oxidado rápidamente en el tubo el cual puede tornarse alcalino. Cuando existe una tensión baja de oxígeno en el fondo del tubo, la reacción ácida debida a la fermentación de la glucosa es mantenida. (1).

Ingredientes básicos:

a) Glucosa, lactosa y sucrosa. La concentración de la glucosa es de 1/10 en relación a lactosa o sucrosa.

b) Rojo de fenol como indicador para elPh:

amarillo : acidez , rojo : alcalinidad

c) Sulfato ferroso, para detectar formación de ácido

FeS : precipitado negro

B) Descripción de Citrato de Simmons, agar.-

Sembrar en estría.

Principio : Utilización del citrato por las bacterias como única fuente de carbón.

Prueba : Positivo = Azul.

Negativo = Verde (sin cambio).

Ingredientes principales:

a) Citrato de sodio.

b) Azul de bromolinol, colorante indicador:

Amarillo = Acido.

Azul = Alcalino.

c) Sulfato de magnesio.

d) Fosfato de monoamonio.

e) Fósforo dipotásico.

El metabolismo de los organismos en crecimiento liberan substancias alcalinas, produciendo una reacción básica (azul). Los organismos que no crecen no afectan el color del medio. (6).

C) Descripción del método SIM (Acido sulfhídrico, Indol y movilidad).-

Sembrar por picadura a la mitad del tubo.

Principio : Es un medio triple para la detección de ácido sulfhídrico, producción de indol y movilidad de las bacterias.

Prueba :

a) Acido sulfhídrico = Negro.

b) Indol = Color rojo si agrega Kovacs.

c) Movilidad = Opacidad del medio.

d) Negativo = Color amarillo claro.

Ingredientes principales :

a) Sulfato ferroso de amonio.

b) Tiosulfato de sodio.

c) Agar al 0.03 por ciento.

d) Peptona.

La producción de H2S produce la formación de sulfito de hierro, un precipitado negro. La peptona contiene el triptófano a partir del cual el indol es producido. El agar a tan baja concentración les permite a los organismos móviles el extenderse a través del medio, produciendo opacidad de éste. (7).

En la tabla 7 (pag.32) se describen las reacciones presentadas por las diferentes especies bacteriales en el método de SIM.

D) Descripción del reactivo Kovacs.-

(prueba para la detección de indol)

Procedimiento : Agregar reactivo de Kovacs a un tubo de SIM inoculado después de 24 - 48 horas. Si es posible agregar 0.5 ml. de cloroformo, el cual favorecerá la extracción del indol.

Esta prueba también se puede hacer en un tubo con caldo triptosa, medio de motilidad de Gillies etc.

Reacción

Positivo = Rojo intenso.

Negativo = Café amarillento.

Reactivos (a) Reactivo de Kovacs

Alcohol amílico o isoamílico 150 ml.

P-Dietilamino benzaldehido 10 gr.

HCL concentrado 50 gr.

Disolver el aldehido en el alcohol, y añadir el ácido lentamente.

(b) Cloroformo, reactivo analitico.

TABLA 7. Reacción TSI (*) en bacilos y cocobacilos Gram negativos (Fondo ácido, superficie alcalina, gas variable y no ácido sulfhídrico).

Reactivo	Bacterias											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Ureasa	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	d
Indol	+	d	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Motilidad	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Oxidasa	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FD	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Nitrato	-	+	+	+	-	+	+	-	-	d	+	+
R.de metilo	+	-	d	+	+	+	+	+	+	+	d	+
V.Proskauer	-	+	d	-	-	-	-	-	-	-	+	-

(*) Triple Azúcar Hierro.
A (Escherichia coli); B (Klebsiella pneumoniae);
C (Vibrio parahemolitycus); D (Proteus mirabilis);
E (Proteus morganii); F (Proteus retigeri);
G (Proteus inconstans); H (Yersinia pseudotuberculosis);
I (Yersinia pestis); J (Salmonella spp.);
K (Hafnia spp.); L (Citrobacter spp.).
FD (fenil-alanina desaminasa).
d (diferentes tipos).

III.- Posteriormente a las pruebas bioquímicas, se realizó una primera resiembra de E. coli en medio de Mac Conkey, con objeto de purificar el cultivo.

IV.- Se procedió a preparar el inóculo de lactobacilos, utilizando para ésto 1 cápsula comercial de Lactobacillus acidophilus liofilizados (1,000,000/cápsula), los cuales se reactivaron agregándolos a 600 ml de agua destilada, más 65 gramos de leche en polvo, agitándose e incubándose a 37 G.C. durante 48 horas.

V.-Cumplidas 48 horas de incubación, se realizó una tinción Gram de la muestra, para observar al microscopio la presencia de los lactobacilos. La metodología de la tinción fué la siguiente :

a) Se tomó una muestra del sobrenadante del cultivo de lactobacilos y se preparó un frótis.
b) Se secó al aire y fijo pasandolo por la flama lentamente 2 o 3 veces.
c) Posteriormente se cubrió el frótis con cristal violeta durante un minuto.
d) Se agregó lugol directamente al frótis(1 min).
e) Se lavó y decoloró con alcohol etílico por 5 a 10 segundos.
f) Se lavó y contrarrestó con safranina (30 seg).
g) Finalmente se lavó y observó al microscopio.

VI.- Tomando una muestra de los lactobacilos, se procedió a hacer una prueba de acción de la catalaza:

Procedimiento : Colocar una azada del cultivo en cuestión en una gota de agua oxigenada al 3 / 100 .

Reacción : Positiva = formación de burbujas de gas (Ox) .

Reactivos : Solución de peróxido de hidrógeno. (6).

VII.- Se realizó una segunda resiembra de Escherichia coli en medio de Mac Conkey, para evitar envejecimiento de colonias y contaminación.

VIII.- Se tomó una muestra del cultivo de los lactobacilos en leche y se sembraron en Triptosa agar y en Mac Conkey. Se utilizó el primer medio para observar el crecimiento y el segundo para determinar la existencia de contaminación por bacterias gram negativas en el cultivo.

IX.- Se tomaron 200 ml del cultivo de Lactobacillus en leche, se colocaron en un matráz y se colocaron a Baño María a 80 G.C. durante 1 hora para matar los bacilos, reconociendo el hecho de una posible pérdida de material termolábil.

X.- Se prepararon las 30 cajas Petri con Triptosa agar, para proceder a la realización del experimento de competencia y antagonismo químico entre Lactobacillus acidophilus y Escherichia coli.

Para la elaboración de los discos sencibles, se utilizó un perforador de papel y papel filtro. Cada disco tiene un diámetro de 0.5 cms. Los discos y demás materiales se esterilizaron en autoclave para evitar contaminación.

Se determinó una clasificación de los posibles resultados del experimento, para facilitar su estudio y comparación estadística, siendo ésta la siguiente:

H .- Presencia de halo; indicio de posible antagonismo químico.

NH .- No presencia de halo.

C .- Competencia definida en crecimiento bacterial.

Una vez clasificados, los resultados fueron evaluados mediante la prueba estadística de chi cuadrada (X*2), mediante la cual se puede determinar la significancia de las diferencias entre k grupos independientes cuando se trata de datos formados por frecuencias en categorías discretas. La hipótesis que usualmente se pone a prueba supone que los k grupos difieren con respecto a alguna característica y, por lo tanto, con respecto a la frecuencia relativa con que los miembros del grupo son encontrados en diferentes categorías. Para probar esta hipótesis, se cuenta el número de casos de cada grupo con la de otro grupo o grupos. (32).

Por medio de un análisis de varianza (29) se determinó,

en el caso del tratamiento 2, si los diámetros del halo, aparecidos en las diferentes repeticiones, pertenecían a una misma población.

Toma de muestra (*Escherichia coli*)

Cultivo

EMB(Agar Eosina Azul de metileno); Mac Conkey

Identificación tentativa

Pruebas bioquímicas

TSI (Triple Azúcar Hierro); Citrato de Simmons agar;

SIM (Ac.Sulfhídrico,Indol y movilidad); Kovacs

Purificación

Cultivo (*Lactobacillus spp.*)

Identificación microscópica

Reacciones

Muerte x ebullición

Prueba experimental

Lactobacillus vivos; *Lactobacillus* muertos; Testigo

FIGURA 4. Diagrama de flujo experimental.

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

En esta sección se incluyen los resultados de las pruebas y reacciones aplicadas a las bacterias que se estudian en este trabajo.

Las pruebas bioquímicas arrojaron los siguientes resultados:

a) La prueba de Triple Azúcar Hierro (TSI), utilizada para la identificación presuntiva de los microorganismos Gram negativos y base para otras pruebas adicionales dio como resultado lo siguiente :

- Fondo ácido.
- Superficie alcalina.
- Variable en gas.
- Sin color negro.

Dicho resultado corresponde, según Bailey (et al) (1), a las siguientes reacciones :

Fermentación de glucosa con formación de gas.
Sucrosa y lactosa no fermentadas.
No producción de ácido sulfhídrico.

b) La prueba del Citrato de Simmons agar, cuyo principio es la utilización del citrato por las bacterias como única fuente de carbón, resultó negativa, lo cual indica que su coloración permaneció constante, ya que según el Manual Difco (6), el metabolismo de los organismos en

crecimiento liberan substancias alcalinas produciendo una reacción básica (azul).

c) De la prueba de SIM (Acido Sulfhídrico, Indol y movilidad), cuyo principio es el de ser un medio triple para la detección de ácido sulfhídrico, producción de indol y movilidad de las bacterias, se obtuvieron los siguientes resultados :

Acido sulfhídrico - Negativo.
Producción de indol - Ver inciso d.
Movilidad - Positivo.

d) La prueba de Kovac, que es complementaria a SIM y cuya utilidad estriba en descubrir la producción de indol, resultó positiva, con viraje a color rojo, lo cúal según el Manual Merck (18) significa lo siguiente :

Muchos microorganismos pueden escindir triptófano, que está presente en abundancia especialmente en la peptona degradada trípticamente, dando ácido pirúvico, amoníaco e indol. Este último reacciona con 4-dimetilaminobenzaldehido produciendo una coloración roja obscura. Puesto que el triptófano da también una reacción coloreada con el 4-dimetilaminobenzaldehido, es preciso hacer una separación del indol. Esto se consigue mediante alcohol amílico que extrae selectivamente el indol.

Haciendo una recopilación de los resultados mostrados en los incisos a,b,c y d podemos compararlos con la tabla 7, del capítulo anterior (Pag. 32) y determinar que la

bacteria en cuestión es Escherichia coli.

e) La observación microscópica de Lactobacillus acidophilus, previa tinción Gram, mostró una similitud marcada con las observaciones mostradas en las figuras 1 y 2 (Pag. 7).

f) La prueba de la Catalaza para los L. acidophilus resultó positiva, lo que significa que hubo desprendimiento de oxígeno, lo cual produjo el burbujeo característico. (6).

g) En cuanto a la prueba de contaminación del medio de leche para los L. acidophilus, fue satisfactoria, ya que no hubo crecimiento bacteriano en medio de Mac Conkey, lo que significó que no había presencia de bacterias Gram negativas.

Los siguientes resultados experimentales se obtuvieron de la observación y clasificación de las respuestas a los tres tratamientos estudiados :

T1 = Lactobacillus acidophilus vivos vs Escherichia coli.

T2 = Productos de Fermentación de Lactobacillus acidophilus vs E. coli.

T3 = Testigo. Agua destilada vs E. coli.

Las características que se observaron fueron las siguientes:

a) Presencia o ausencia de un halo que indique una

acción antimicrobiana alrededor del disco indicador.

b) Diámetro del halo.

c) Competencia evidente entre especies bacterianas.

d) Mezcla de características.

En la tabla 8 pueden observarse los resultados obtenidos en los tres tratamientos :

TABLA 8. Resultados de características observadas en pruebas de antagonismo químico y competencia entre cultivos de Lactobacillus acidophilus y Escherichia coli.

	Tratamiento 1			Tratamiento 2			Tratamiento 3		
R	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	c	c	-	h	h	h	n	n	n
2	c	c	n	n	h	h	n	n	n
3	c	c	c	h	h	h	n	n	n
4	c	c	c	h	h	n	n	n	n
5	c	h	n	h	n	h	n	n	n
6	c	c	h	h	h	n	n	n	n
7	c	c	c	h	h	h	n	n	n
8	c	c	c	h	h	h	n	n	n
9	c	c	c	h	h	h	n	n	n
10	c	c	c	h	h	-	n	n	n

Tratamiento 1 = Lactobacillus acidophilus vivos vs E. coli.
Tratamiento 2 = Productos de fermentación de L. acidophilus vs E. coli.
Tratamiento 3 = Testigo. Agua destilada vs E. coli.
A B C = Discos por caja.
R = Repetición.
c = Competencia.
h = Presencia de halo.
n = No presencia de halo.

Los resultados expuestos en la tabla anterior se resumen para su mejor apreciación en la tabla 9 :

TABLA 9. Resumen de resultados de las características observadas en pruebas de antagonismo químico y competencia entre *Lactobacillus acidophilus* y *Escherichia coli*.

Tratamiento	Obs.	H	N	C
L.acidophilus vivos	10	2	2	25
PFL	10	25	4	0
Testigo (Agua destilada)	10	0	30	0

PFL = Productos de Fermentación de lactobacilos.
H = Presencia de halo.
N = No presencia de halo.
C = Competencia.

Como los datos de la investigación están formados por frecuencias en categorías discretas (ordinales), la prueba de Chi cuadrada puede determinar la significancia de las diferencias entre k grupos independientes. (32).

El resultado de la prueba de Chi cuadrada fué el rechazo de la hipótesis de nulidad, la cuál supone que las k muestras de frecuencias o proporciones proceden de la misma población o de poblaciones idénticas.

Lo anterior deriva de que el valor de Chi cuadrada fué 133.57, el cuál comparado con la tabla de valores críticos utilizando 4 grados de libertad, es mayor.

La prueba de Chi cuadrada fué concluyente, al indicarnos que todos los tratamientos mostraron características estadísticamente diferentes.

En la tabla 10 se muestran los resultados porcentuales de las características presentadas por los tratamientos.

TABLA 10. Presentación porcentual de las características mostradas por tres tratamientos para determinar la acción antagónica de Lactobacillus acidophilus contra Escherichia coli.

Tratamiento	Obs.	H	N	C
1 (L. acidophilus vivos)	10	6.8	6.8	86.2
2 (PFL)	10	86.2	13.8	0.0
3 (Testigo. Agua destilada)	10	0.0	100.0	0.0

T = Tratamiento.
Obs. = No. de observaciones.
H = Presencia de halo.
N = No presencia de halo.
C = Evidencia de competencia.
PFL = Productos de Fermentación.

El tratamiento 2, en el que se probó la posible acción antimicribiana, mostró en los discos indicadores los diámetros de halo expuestos en la tabla 11.

TABLA 11. Diámetros de halo en discos indicadores bajo tratamiento con PFL(*) para determinar acción antimicrobiana sobre Escherichia coli.

D	Repetición									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	2	-	.5	3	.5	3	1	.5	.5	1
B	1	3	.5	3	-	3	1	.5	1	1
C	1	3	.5	-	.5	-	2	.5	4	-

(*)PFL = Productos de Fermentación de lactobacilos.
D = Disco indicador.
Cantidades en centímetros.

Los resultados en cuanto al diámetro del halo en el tratamiento 2, fueron sometidos a un análisis de varianza, con objeto de determinar si pertenecían a una misma población, y así probar si el efecto creado muestra un comportamiento relativamente estable o si existe variabilidad en su acción. (tabla 12).

TABLA 12. Análisis de varianza para diámetros de halo en discos indicadores bajo tratamiento con PFL(*) para determinar uniformidad en acción antimicrobiana contra Escherichia coli.

Causas de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	F05	F01	
Tratamientos	2	0.41	0.20	0.14	3.4	5.7	N.S.
Error	22	30.59	1.39				
Total	24	31.00					

(*)PFL = Productos de Fermentación de lactobacilos.
C.V. = 78.59 Por ciento.

El análisis de varianza muestra una no significancia en la diferencia entre tratamientos, lo que indica que pertenecen a una misma población, entendiendo así, que los resultados en cuanto a la acción antimicrobiana son estables en cuanto al diámetro de incidencia, pero el coeficiente de variabilidad indica que los datos no son confiables, por lo tanto no se puede aseverar que existe uniformidad en los diámetros de halo.

Michel y Kenworthy (19), al trabajar con bacterias productoras de ácido láctico encontraron que nueve especies de éstas inhiben el crecimiento de Escherichia coli establecida en agar. Dentro de éstas, el Streptococcus

faecium y Lactobacillus bulgaricus tuvieron una actividad celular anti E. coli significativa. Caldos conteniendo fermentos de L. bulgaricus produjeron altos niveles de anti-toxina, que fueron benéficos al ser añadidos a las dietas de cerdos destetados precozmente.

Hamdan y Mikolajcik (14), estudiaron seis cepas de Lactobacillus acidophilus establecidas en leche descremada. Observaron que las cantidades de células viables se mantuvieron constantes por 14 días a 5 G.C. Se estableció una actividad antimicrobiana de L. acidophilus contra Escherichia coli, Pseudomonas fluorescens y Staphylococcus aureus. Aunque la actividad antimicrobiana fué en parte asociada con la producción de ácido láctico y Ph bajo, se cree que otros productos metabólicos se encuentran involucrados.

Los resultados de este experimento, concuerdan con los resultados encontrados por otros autores. Es obvia la actividad antimicrobiana, establecida de 2 maneras: provocando un área de no crecimiento de Escherichia coli alrededor de los discos impregnados de productos de fermentación de Lactobacillus acidophilus, y competencia favorable a estos, en el caso de discos impregnados con lactobacilos vivos.

Lactobacillus acidophilus es pues, una bacteria gram positiva que ejerce una acción antagónica sobre Escherichia coli. Tal efecto se explica en base a que L. acidophilus

produce ácido láctico y provoca con esto una reducción en el Ph del substrato a 5.3 -5.0, inhibiendo el desarrollo de E. coli, la cual requiere un Ph mayor (6.0 - 7.0) y a su vez existen evidencias sobre actividad antimicrobiana provocada por productos metabólicos. (14).

En la figura 5 se muestran las fotografías de un ejemplo del tratamiento 1, en el que se aprecia la presencia de un halo alrededor del disco indicador (A) y una competencia entre Lactobacillus acidophilus y Escherichia coli, en la que paulatinamete se ve una superioridad de L. acidophilus (B).

FIGURA 5. Fotografías mostrando la acción antimicrobiana de los Productos de Fermentación de Lactobacillus acidophilus contra Escherichia coli (A) y la competencia entre ambas especies (B).

C O N C L U S I O N E S

En base a las condiciones en que se llevó a cabo el experimento se puede concluir lo siguiente:

1.- Existe una marcada competencia entre *Lactobacillus acidophilus* y *Escherichia coli*, en la que se puede apreciar una superioridad de *L. acidophilus*.

2.- Los Productos de Fermentación de *Lactobacillus acidophilus* presentan un antagonismo químico sobre *Escherichia coli*, impidiendo su crecimiento y de esta manera, actuando como agente antimicrobiano.

R E S U M E N

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Diagnóstico de Patología Animal, en terrenos de la Exposición Ganadera, en el municipio de Guadalupe N.L.; fueron utilizadas 30 cajas petri, cada una de las cuales constaba de 3 discos indicadores, con los que se probaron los siguientes tratamientos: T1:Lactobacillus acidophilus vivos implantados en un cultivo de E. coli. T2:Productos de Fermentación de Lactobacillus acidophilus implantados en un cultivo de Escherichia coli. T3:Testigo a base de agua destilada implantada en cultivo de E. coli.

Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas : Triple Azúcar Hierro (TSI), Citrato de Simmons, Acido sulfhídrico, indol y movilidad (SIM), Kovacs, Reacción a la Catalaza, además de observación microscópica y cultivos selectivos. Mediante todas estas pruebas se estableció la identidad de Lactobacillus acidophilus y Escherichia coli.

Las características evaluadas fueron : Presencia o ausencia de halo en los discos indicadores, competencia entre bacterias, uniformidad en las características, determinando así la existencia de un antagonismo químico o acción antimicrobiana.

Los resultados fueron los siguientes: Presencia de halo T1 2 por ciento, T2 86.2 por ciento y T3 0 por ciento; Competencia T1 86.2 por ciento y 0 en T2 y T3, el Testigo no presento ninguna reacción. Los datos se sometieron a una

prueba de Chi cuadrada y se obtuvo una diferencia significativa. De el tratamiento 2 que presentó la característica de formación de halo, se tomaron los diámetros de este y se hizo un análisis de varianza, resultando pertenecer todos a una misma población, con un coeficiente de variabilidad indicando no confiabilidad de los datos.

Finalmente se concluye que existe una competencia marcada entre Lactobacillus acidophilus y Escherichia coli en la que se muestra superioridad por parte de los lactobacilos, existiendo a su vez un antagonismo entre los Productos de Fermentación de L. acidophilus y E. coli.

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

1.- Bailey, R.W. y E.G. Scott. 1970. Diagnostic Microbiology. 3ra Edición. The Masby Company, Saint Louis. pp. 36-88.

2.- Bechman, T.J. 1977. Influence of Lactobacillus acidophilus on performance of young dairy calves. Jour. Dairy Sc. 60:75.

3.- Beeman, K.B. 1976. Diarrea en becerros. Boletín Probiotics de México S.A. Monterrey N.L.

4.- Beeman, K.B. y J. Thovenille. 1975. Investigación con la pasta para cerdos Primalac. Boletín Probiotics de México S.A. Monterrey N.L.

5.- Davis, V.A. 1979. Response of calves fed a Lactobacillus fermentation product. Jour. Dairy Sc. 62(suppl):104.

6.- Difco Manual. 1953. Difco Laboratories Inc. Detroit, Michigan 9th ed.

7.- Difco Supplementary Literature. 1968. Difco Laboratories Inc. Detroit, Michigan 48201 U.S.A.

8.- Dunne, H.W. 1970. Diseases of Swine. Tercera edición. The Iowa State University Press. U.S.A. pp. 587-589,600.

9.- Engnell B. 1979. Efectos del Primalac en cerdos en crecimiento y engorda. Boletín Probiotics de México S.A. Monterrey N.L.

10.- Foster, E.M., E.E. Nelson, M.L. Speck, R.N. Doetsch y J.C. Olson. 1957. Dairy Microbiology. Cuarta edición. Prentice-Hall, Inc. U.S.A. pp. 17-27, 323-325.

11.- Gillies, R.R. y T.C. Doodds. 1976. Bacteriology Illustrated. Cuarta edicion. Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York. pp. 78-79.

12.- Guilligand, S.E. 1980. Comparison of strains of Lactobacillus acidophilus as dietary adjuncts for young calves. Jour. Dairy Sc. 63(6):966-971.

13.- Hale, O.M. y G.L. Newton. 1979. Effects of nonviable Lactobacillus species fermentation products on performance of pigs. J. Anim. Sci. 48(5):770-775.

14.- Hamdan, I.V. y E.M. Mikolajcik. 1973. Growth, viability and antimicrobial activity of Lactobacillus acidophilus. Jour. Dairy Sc. 56:638. (Abst).

15.- Hammer, B.W. 1948. Dairy Bacteriology. Tercera edición. John Wiley & Sons. U.S.A. pp. 17,18.

16.- Hatch, R.C. 1973. Effect of adding Bacillus acidophilus to milk fed to baby calves. Jour. Dairy Sc. 56(5):682.

17.- Kohler, E.M. 1978. Neonatal enteric colibacillosis of

pigs and current research on inmunization. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 173(5):588-591.

18.- Merck E. 1972. Manual de Microbiología. Darmstadt R.F. de Alemania. pp. 124,165,223,304.

19.- Michell, I. De G. y R. Kenworthy. 1976. Investigations on a metabolite from Lactobacillus bulgaricus which neutralizes the effect of enterotoxin from Escherichia coli pathogenic for pigs. J. Appl. Bact. 41:163.

20.- Morris B.J. y M.J. Gerstein. 1960. Handbook of Microbiology. D. Van Nostrand Company, Inc. Princeton New Jersey. pp. 68-69.

21.- Muralidhara, K.S. 1974. Effect of feeding concentrates of lactobacillus organism on intestinal colonization by Escherichia coli in swine. Dissertation Abs. International. 34 B(12):6125-6126.

22.- Muralidhara, K.S.; W.E. Sandine; P.R. Elliker y D.C. England. 1972. Effect of feeding lactobacillus concentrates on coliform excretion and scouring in swine. Jour. Dairy Sc. 55:661 (Abs.).

23.- Muralidhara, K.S.; W.E. Sandine; P.R. Elliker y D.C. England. 1973. Colonization of Escherichia coli and lactobacillus in intestine of pigs. Jour. Dairy Sc. 56:635 (Abs.).

24.- Muralidhara, K.S.; G.G. Sheggeby; P.R. Elliker; D.C.

England y W.E. Sandine. 1977. Effect of feeding Lactobacilli on the Coliform and Lactobacillus Flora on Intestinal Tissue and Feces from Piglets. Jour. of Food Protection 40(5):288-295.

25.- Nielsen, N.O.; H.W. Moon y W.E. Roe. 1968. Enteric colibacillosis in swine. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 153(12):1590-1606.

26.- Perez, A.S. 1981. Utilización de un cultivo de Lactobacillus acidophilus como control de diarreas en lechones. Tésis sin Publicar. I.T.E.S.M.

27.- Poolmann, D.C.; D.M. Danielson y E.R. Peo, Jr. 1980. Effect of Lactobacillus acidophilus on starter pigs feed a diet supplemented whit lactose. J. Anim. Sci. 51(3):638-643.

28.- Poolmann, D.C.; D.M. Danielson; W.B. Wren; E.R. Peo, Jr y K.M. Shahani. 1980. Influence of Lactobacillus acidophilus inoculum on gnotobiotic and conventional pigs. J. Anim. Sci. 51(3):629-637.

29.- Reyes, C.P. 1980. Diseño de Experimentos Aplicados. Segunda edición. Ed. Trillas, S.A. México. pp. 122-125.

30.- Salle, A.J. 1962. Bacteriología. Ed. Gustavo Gil, S.A. Barcelona. pp. 260-263.

31.- Schwab C.G.; Moore J.J.. III; Hoyt, P.M. y J.L. Prentice. 1980. Performance and fecal flora of calves fed a

nonviable Lactobacillus bulgaricus fermentation product. Jour. Dairy Sc. 63:1412-1423.

32.- Siegel, S. 1976. Estadística No Paramétrica Aplicada a las Ciencias de la Conducta. Tercera Reimpresión. Ed. Trillas. S.A. México. pp. 204-209, 283.

33.- Sojka, W.J. 1965. Escherichia coli in domestic animals and poultry. Commonwealth Bureaux. Farnham Royal, Bucks., England. pp. 1,125,150,151.

34.- Sojka, W.J. 1979. Colibacilosis entérica en cerdos. Memorias del 1er curso latinoamericano de enfermedades gastrointestinales del cerdo. Ed. Alcazar y Rodríguez. México.

35.- Sthal, A. 1976. Experimento Primalac con Gallinas Ponedoras. Boletín Probiotics de México S.A. Monterrey N.L.

36.- Takeuchi, A. y D. Savage. 1973. Adherance of lactobacilli and yeast to murine gastric epithelium. Paper presented at annual meeting of the Am. Soc. Microbiol. Miami Flo. U.S.A.

37.- Whipp, S.C. y S.T. Donta. 1976. Serum antibody to Escherichia coli Heat-Labile enterotoxin in cattle and swine. Am. J. Vet. Res. 37(8):905-906.

38.- Wilson, M.R. 1974. Inmunologic development of the neonatal pig. J. Anim. Sci. 38(5):1018-1021.

A P E N D I C E

DESCRIPCION DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA DE CHI CUADRADA PARA k MUESTRAS INDEPENDIENTES. (32).

1.- Se ordenan las frecuencias observadas en una tabla de contingencia k x r.

2.- Se determina la frecuencia observada conforme a Ho para cada celdilla con el producto de los totales marginales comunes a la celdilla y la división de este producto por N (suma de cada grupo de totales marginales).

3.- Se calcula X*2 con la fórmula siguiente :

$$X^{*}2 = \sum_{i=1}^{r} \sum_{j=1}^{k} \frac{(Oij - Eij)^{*}2}{Eij}$$

donde Oij = número de observaciones de esa clasificación en la fila i de la columna j.

Eij = número de casos esperados en conforme a Ho que clasificarán en la fila i de la columna j.

$\sum_{i=1}^{r} \sum_{j=1}^{k}$ = sumar en todas las filas (r) y en todas las columnas (k). es decir, sumar las celdillas.

4.- Se determinan los grados de libertad

$$gl = (k-1)(r-1)$$

5.- Se determina la significancia del valor observado de X*2; si la probabilidad de este es igual o menor que Alfa = 0.05, se rechaza Ho y se acepta H1.

Centro de Información-Biblioteca
30002005335922