

Identificación molecular de lactobacilos del tracto digestivo del lechón (*Sus scrofa domestica*)

Molecular identification of lactobacilos of the digestive tract of piglet (*Sus scrofa domestica*)

Héctor Sánchez S.*; Gloria Ochoa M.

Resumen

Los animales cuando nacen no presentan bacterias en su tracto digestivo, este va adquiriendo múltiples bacterias de su entorno las cuales que se establecen y permanecen durante las diferentes las etapas de su vida, muchas de estas bacterias están ligadas a la alimentación del animal, ejercen diferentes acciones benéficas, colonizan y logran ser parte de la flora natural del animal. Con el objeto de estudiar parte de esta diversidad microbiana y su efecto en lechones (*Sus scrofa domestica*), se aislaron, identificaron y caracterizaron bacterias cultivables asociadas al tracto digestivo del lechón como las Bacteria ácido láctica BAL, la identificación se realizó mediante caracterización bioquímica encontrando 39 y 35 bacterias cultivables aisladas de diferentes regiones del tracto digestivo de dos lechones provenientes del estómago, duodeno, yeyuno e íleon del intestino delgado y además del ciego, colon y recto, para la acción BAL se descartaron bioquímicamente, quedando 9 y 15, se identificaron molecularmente 8 bacterias con secuencias conservadas del gen 16S ARNr encontrando semejanzas genéticas entre ellos para *Bacillus fermentus* y 01 *Lactococcus lactis*, todas conocidos como bacterias ácido lácticas con efecto benéfico para la industria alimentaria.

Palabras clave: bacterias; ácido lácticas; lechones; microbiología molecular; BAL.

Abstract

The animals when they are born do not present bacteria in their digestive tract, this one is acquiring multiple bacteria of its surroundings which settle down and remain during the different stages of its life, many of these bacteria are linked to the animal's food, they exercise different beneficial actions, they colonize and they become part of the animal's natural flora. In order to study part of this microbial diversity and its effect on piglets (*Sus scrofa domestica*), Isolates, identified and characterized cultivable bacteria associated with the digestive tract of suckling pig such as lactic acid bacteria BAL, The identification was made by biochemical characterization by finding 39 and 35 cultivable bacteria isolated from different regions of the digestive tract of two piglets from the stomach, duodenum, jejunum and ileum of the small intestine and in addition to the cecum, colon and rectum, for BAL action were discarded biochemically, leaving 9 and 15, molecularly 8 bacteria were identified with conserved sequences of the 16S rRNA Finding genetic similarities between them for *Bacillus fermentus* and 01 *Lactococcus lactis*, all known as lactic acid bacteria with beneficial effect for the food industry.

Keywords: lactic acid; piglets; molecular microbiology; BAL.

Departamento de Sanidad Vegetal y Producción Pecuaria, Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes, Perú.

* Autor correspondiente: hsanchezs@untumbes.edu.pe (H. Sánchez).

Introducción

La cría de cerdos intensiva así mismo la demanda de carne como fuente proteica crece conforme se incrementa la población humana, la crianza de lechones, es la fase crítica en el proceso de producción ya que determina la viabilidad de la misma, se debe evitar que los lechón presenten cuadros diarreicos al momento del destete para lo cual se empleando antibióticos y otras compuestos sintéticos como promotores de crecimiento, que aumentan los costos de producción y los riesgos ambientales de su uso (Cadillo, 2008).

La retirada de los antibióticos como promotores de crecimiento en la UE desde enero de 2006, ha creado la necesidad de avanzar en la búsqueda de

otros aditivos nutricionales no antibióticos (Metzler, 2010). Debido a esto, se ha estudiado la influencia de diversos microorganismos, en especial de bacteria nativas del género *Lactobacillus*, sobre la eficiencia productiva del lechón (Cueto-Vigil *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012)

A fin de solucionar la problemática formulada, se planteó la hipótesis de encontrar Lactobacilos en el tracto digestivo del lechón *Sus escrofa domesticus*.

En este contexto los objetivos de la investigación fueron: aislar, caracterizar e identificar molecularmente las bacterias asociadas al tracto digestivo del lechón, los cuales tengan actividad probiótica.

Materiales y Método

El estudio se realizó en dos fases: fase de extracción de muestras en campo y fase de análisis de laboratorio, La fase de campo se tomó en dos puntos el primer lechón se realizó en Los Cedros, Distrito

de San Pedro de Los Incas (Corrales) geográficamente ubicada a 3°36'58.24" S 80°31'49.75" O y la otra en el cercado de Tumbes, Perú ubicada 3°35'12.96" S 80°26'45.15" O (Fig. 1).

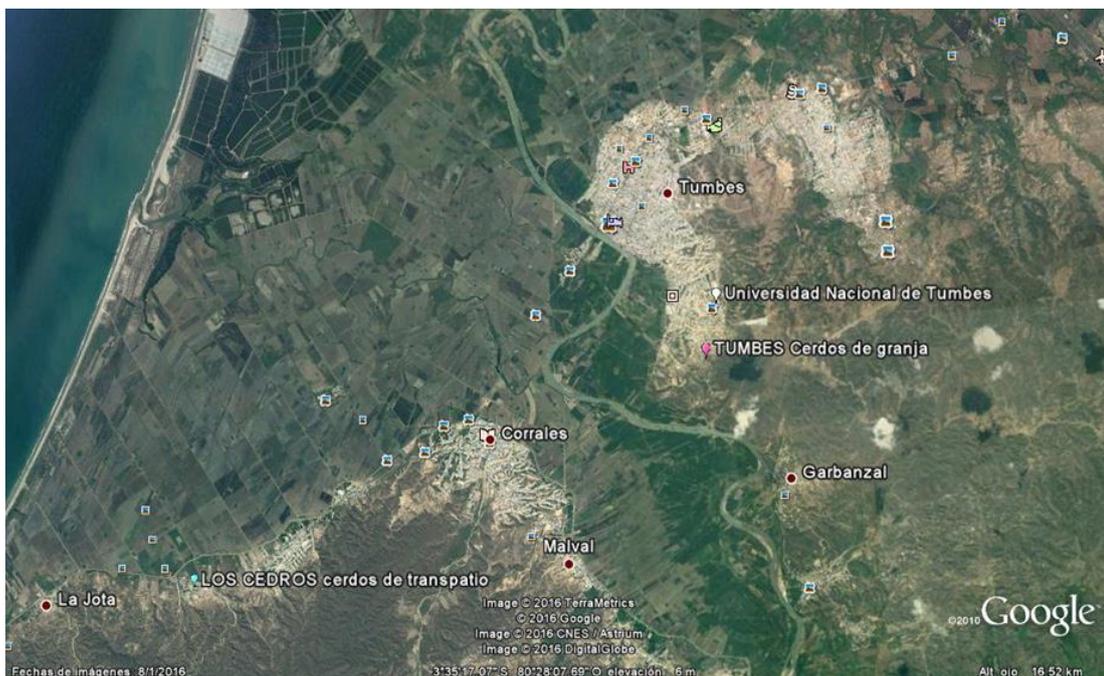


Figura 1. Ubicación de los lugares de la toma de muestra y trabajo experimental Tumbes – Corrales (los cedros).

La segunda fase se desarrolló en el laboratorio de biología molecular, Departamento de Biología, Escuela de Enfermería de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Tumbes para los aislamientos y análisis microbiológicos como genéticos.

Población

Determinada por las bacterias presentes en diferentes regiones del tracto digestivo del lechón. En donde los lechones seleccionados fueron cruzados de las razas Landrase/yorkshire (50/50) criados en traspatio, animales sanos de siete días pos destete y alimentados con alimento balanceado a base de maíz, soya y polvillo.

Muestra

Estuvo conformado por bacterias con características ácido-lácticas presentes en diferentes regiones del tracto digestivo del lechón.

Muestreo

Se realizó mediante hisopado de diferentes regiones del tracto digestivo del lechón, los lechones fueron de 42 días de edad (lechón uno) y de 39 días de edad (Lechón dos) las regiones fueron, estómago (E), estómago esófago (EE), duodeno (D), yeyuno (Y), íleon (I), ciego (C) y colon (Co) de animales sanos y del recto de lechones (animales con cuadros diarreicos).

Fase de campo

Aislamiento de bacterias nativas

En crianza porcina de traspatio en dos corrales de la periferia de la ciudad de Tumbes, Perú, se seleccionó un lechón en cada uno de los dos corrales de muestreo, para realizar el aislamiento de las bacterias nativas, en el lechón de una semana pos destete, considerando que ya pasó el destete que es la etapa digestiva más crítica del lechón donde cambia la alimentación líquida por la sólida, los lechones fueron de 42 días de edad (primer lechón) y 39 días de edad (segundo Lechón) respectivamente (ambos con siete días pos destete, donde los

días de destete varía según criador), alimentado con dieta base de maíz, soya y polvillo, sin antibiótico.

En ambos lechones se procedió a la realización de laparotomía, cumpliendo con los estándares de ética; para el proceso quirúrgico se utilizó la ketamina como anestésico disociativo, dosis de 3 mg por kilogramo de peso vivo, vía intravenosa, para evitar el estrés, la vía fue en la vena tibial medial, lentamente para evitar posibles embolias.

Se tomaron muestras con un raspado de la mucosa con hisopos estériles previamente autoclavados obteniendo 35 muestras de lechón uno, de diferentes partes del tracto digestivo, extraídas seis del estómago (E), seis del estómago - esófago (EE) , dos del duodeno (D), cinco del yeyuno (Y), cuatro del íleon (I), seis del ciego (C) y seis del colon (Co), y del segundo lechón se obtuvieron 39 muestras del estómago - esófago (EE), tres del estómago (3 E), cuatro del duodeno (D), siete del yeyuno (Y), seis del íleon (I), tres del ciego (C) y diez del colon (Co) (Fig. 2).

Fase de laboratorio

Aislamiento de cepas de lechón sano

Las muestras obtenidas de diferentes regiones del tracto digestivo del lechón (para ambos lechones por igual), fueron transportadas en tubos Falcón de 50 ml conteniendo caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) medio para bacterias ácido-lácticas con un pH: 5-6 y a temperatura ambiente.

Los sobrenadantes obtenidos en los tubos Falcón que contenían las muestras, fueron utilizados como soluciones madre para realizar diluciones decimales (1/5, 1/10 y 1/20), las cuales fueron depositadas en tubos Eppendorf. Las placas fueron expuestas a temperatura ambiente por 24 horas, para promover el desarrollo de microorganismos. Luego se realizaron diluciones seriadas hasta 20-2 y fueron sembradas posteriormente por superficie en placas Petri con agar MRS a pH 6,5. Se realizaron purificaciones consecutivas en agar MRS+bacto agar hasta obtener bacterias puras.

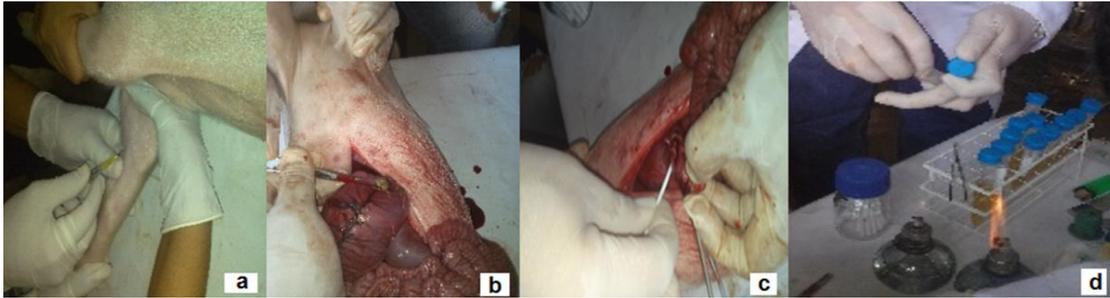


Figura 2. Lechón para extracción de BAL, a) Aplicación de anestésico, b) Toma de muestra estómago, c) Toma de muestra duodeno, d) Colección de muestras.

Se caracterizaron las BAL por el método de Yimin *et al.* (2005), según evaluación de características externas coloración Gram, para este caso Gram positivas; presentación de esporas, no es viable el que forma esporas (Fig. 4).

Pruebas bioquímicas como Catalasa negativa (las BAL no tiene la enzima que degradan el peróxido de hidrógeno); oxidasa negativa (las BAL no son aeróbicas por lo que no necesitan en su metabolismo oxígeno); producción de CO₂ (negativo) las tres relacionadas con el metabolismo de azúcares por las BAL, probando la resistencia a condiciones adversas en el tracto digestivo. Se probaron concentraciones de 1%, 5% y 10% de sales biliares, cloruro de sodio 5%, 10% y 18% y con PH de 2,5 - 3,5 - 4,5.

Paralelamente se realizó la preparación de los medios de cultivo en placas Petri, donde se depositó 75 µl de cada dilución de la muestra anterior, se sembraron por estría en agar MRS suplementada con azul de anilina (0,012 %) y con la ayuda de una haza metálica se extendió por toda la placa (Fig. 3), dónde como pruebas de viabilidad se obtuvieron del primer lechón, siete cepas estómago, una en

ciego y una en colon y en el segundo lechón, cuatro cepas estómago, dos del duodeno, cuatro en el yeyuno, cuatro en íleon, dos en ciego y cinco en colon, con capacidad antibiótica por método difusión en pocillo según Vélez (2014) y Ramírez (2009) (Fig. 4). Estas cepas fueron conservadas en tubos con agar MRS inclinado a 4 °C y congeladas a -20 °C en caldo MRS suplementado con 30% de glicerol.

Extracción de ADN

Identificación molecular mediante secuenciación del gen 16S ARNr

Las extracciones de ácidos nucleicos se realizaron utilizando el método estándar CTAB-DTAB (Dulanto, 2013). Las cepas bacterianas fueron sembradas en tubos de vidrio con 10 mL Caldo Tripticasa Soya (TSB) e incubadas a 28-30 °C por 24 h, se tomó 1 mL de la suspensión bacteriana a un microtubo de 1,5 mL de volumen, se centrifugó a 13 mil rpm durante 5 min, quedando el pellet, se eliminó el sobrenadante, y posterior-mente se pesó la biomasa de células en una balanza analítica (15 a 25 mg).



Figura 3. a). Muestras, b). Preselección de BAL sembradas en MRS con azul de anilina, c). Selección de BAL en MRS.

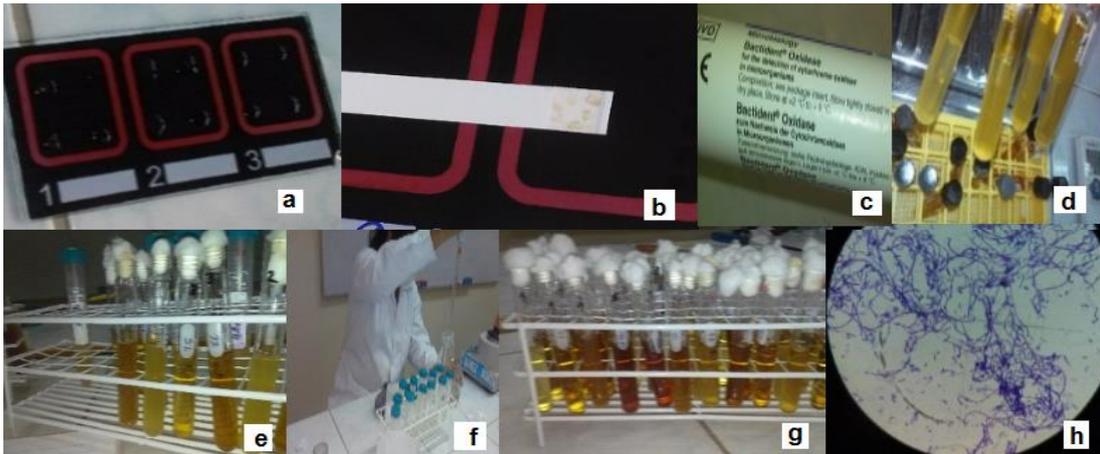


Figura 4. Pruebas bioquímicas: a) Catalasa negativa, b y c) Oxidasa negativa, d) Presencia de CO₂, e) Tinción Gram, f) Prueba de resistencia a sales biliares, e i) Prueba resistencia cloruro de sodio y pH de las BAL.

Al microtubo con el pellet se le agregó 600 μ L de solución DTAB (dodecil-trimetilamonio bromuro 8%, NaCl 1,5 M, Tris HCl 100 mM pH 8,8 y EDTA 50 mM) y con ayuda de micropistilos plásticos se homogenizó ayudando a la lisis celular, se incubó a 75°C por 15 minutos y se mezcló con el vortex por 20 segundos.

Se adicionó 700 μ L de cloroformo HPLC y se mezcló nuevamente en vortex por 20 segundos, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos y se transfirió 250 μ L del sobrenadante a otro microtubo que contenía previamente 100 μ L de solución CTAB (5% cetiltrimetilamonio bromuro, 0,4 M NaCl) y 900 μ L de agua destilada.

Este nuevo microtubo se incubó a 75 °C durante 5 minutos y se centrifugó a 13 mil rpm durante 10 min. Inmediatamente, se separó el sobrenadante y se resuspendió el ADN con 150 μ L de solución disolvente (NaCl 1,2 M) incubándose a 75 °C durante 5 min, se centrifugó a 13 mil rpm durante 5 min, luego se transfirió 150 μ L de la solución a un nuevo microtubo que previamente contenía 300 μ L de etanol absoluto. Este nuevo microtubo fue mezclado con el vortex por 20 segundos y se centrifugó a 130 mil rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante cuidando de no perder el pellet de ADN y se agregó 500 μ L de etanol al 75% para lavar el ADN y finalmente, el ADN fue resuspendido con

200 μ L de tampón TE (Tris 10 mM- EDTA 1 mM) y almacenado a -20 °C.

Amplificación del ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar la región 16S ARNr, se utilizó los cebadores universales 518F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') y 1510R (5' GGC TAC CTT GTT ACG A 3') descritos por Weisburg siguiendo el procedimiento de Alfaro (2010). El volumen final de cada reacción será 20 μ L, constituida por 2 μ L de buffer Taq 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs (100 mM), 1 U de Taq ADN polimerasa, 10 pmol de cada cebador y 2 μ L de ADN extraído en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal) y programado en un ciclo de 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 5 min.

Verificación del ADN por electroforesis

Para la electroforesis se utilizó 10 μ L de cada producto de amplificación, los cuales fueron migrados en gel de agarosa al 1 % con tampón de migración TAE 1X, la migración se realizó a 120 voltios durante 20 min; paralelamente se hizo migrar un marcador de peso molecular de 100 a 1000 pares de bases (pb), posteriormente los geles fueron visualizados utilizando un transiluminador UV y fotografiados con cámara digital.



Figura 5. Extracción de ADN: a) Lisis de células, b) Centrifugación, c) Termociclador, d) ADN extraído, e) Electroforesis de las BAL.

Secuenciación

Para la secuenciación se utilizó 10 μ l de los productos obtenidos por amplificación en la PCR los cuales fueron colocados en microtubos de 0,2 mL, además, se preparó en microtubos de 0,2 mL por-

ciones de 5 μ L de cada cebador universales para el gen 16S ARNr, estas fueron empacadas y enviadas a la empresa MacroGen de Korea, para realizar la secuenciación de las 2 cadenas de cada producto amplificado (Figura 5).

Resultados

Aislamiento y caracterización bioquímica de bacterias cultivables asociadas al tracto digestivo de lechón.

En la Tabla 1 se muestra como a partir de las muestras iniciales recogidas de las diferentes partes del tracto digestivo del lechón, tanto del 1 como del dos (35 y 39 respectivamente); se van obteniendo las BAL cultivables y se van descartando en función a especificidad del medio, inicialmente en la pre selección con MRS + azul de anilina al 0.012%, quedaron 32 y 35 colonias, las cuales con las continuas purificaciones en MRS y la identificación morfológica se obtuvieron 16 y 21 colonias; cuya caracterización fue complementada a través de procesos bioquímicos mediante pruebas de catalasa, oxidasa y presencia de CO₂, donde se obtuvieron 9 y 21 BAL, las cuales se sometieron a las pruebas de resistencia con sales biliares, pH y cloruro de sodio dando como resultado la obtención de 9 y 15 BAL en el lechón uno y dos respectivamente. Al final 7 BAL del segundo lechón y 2 BAL del primer lechón, presentaron características probióticas, al tener resistencia a las sales biliares, acidez y cloruro de sodio en forma complementaria y antagonismo a dos patógenos del lechón.

En la Tabla 2 se observa la caracterización morfológica y bioquímica de las BAL halladas, donde se encontró que todas las colonias se tiñen de azul, seleccionándolas como BAL por la especificidad del medio y por lo tanto son bacilos Gram positivos, todas ellas frente a las pruebas bioquímicas reacción negativa para la prueba de catalasa, oxidasa y CO₂ (excepto BAL 9), también se puede considerar que todas son ácidas con PH que van de 3,75 a 5,74 y en función a las pruebas de resistencia, para este caso no tuvieron resistencia a las sales biliares la BAL 9 y 14, mientras que la BAL 1, 2 y 9 no mostraron resistencia a la cloruro de sodio, pero todas se mantienen viables en pH 4,5. Las características morfológicas, bioquímicas y pruebas de resistencia son criterios para el descarte de BAL con capacidad probiótica.

Aislamiento y caracterización bioquímica de bacterias cultivables asociadas al tracto digestivo de lechón

Identificación molecular de las bacterias cultivables asociadas al tracto digestivo de lechón, mediante microbiología molecular.

Identificación molecular de las bacterias BAL.

Los resultados de la identificación de cepas seleccionadas de la micro biota gastro-intestinal en lechón pos destetado, mediante la amplificación de la secuenciación con el gen 16S ARNr (secuencia específica para identificar procariotas), identificadas mediante programa de bioinformática MEGA 6 y Blast fueron: para la cepas iguales BAL 2 y BAL 4, con BAL 6 y BAL 9, tiene alta similitud para el *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 DNA, (Anexo 1), con una identidad de 99% y cobertura de 99% de la secuencia nucleotídica, quiere decir que todas las secuencias encontradas como resultado del análisis molecular de la BAL en estudio (PubMed National Center for Biotechnology, 2016).

Las cepas bacterianas aisladas del tracto digestivo del lechón son parecidas entre BAL 1, con BAL 10, igual con BAL 14 y todas semejantes con BAL 8, estas tienen alta similitud con el *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885 (Anexo 2), con una identidad de 99% y cobertura de 99% de la secuencia nucleotídica correspondiente. Excepto la BAL 8 que

tiene 99% de identidad y cobertura de 77% (Puede National Center for Biotechnology, 2016).

La BAL 7, encuentra alta semejanza con las bacterias *Lactococcus lactis* subsp. *tractae* strain L105 16S ribosomal RNA (Anexo 3), con una identidad de 99% y cobertura de 99% de la secuencia nucleotídica correspondientes (PubMed National Center for Biotechnology, 2016). En la tabla 3 y la fig. 6 se muestra que 8 de las 9 cepas molecularmente identificadas tiene alta cobertura e identidad con la bacteria denominada *Lactobacillus fermentum*, encontrando pequeñas diferencias entre cepas, y donde la BAL 7 corresponde a *Lactococcus lactis*, todas pertenecen al orden Lactobacillales, cuyo árbol filogenético muestran valor de diferencia porcentual menores de 1, determinando su cercanía de parentesco entre ellas (Fig. 6).

En la Figura 7 se verifica la presencia de ADN de las muestras y el peso molecular en pares de bases aproximados comparados con el marcador de peso, en la figura se observa las manchas oscuras entre la línea que corresponde a 1500 y 2500 pb.

Tabla 1. Identificación y caracterización de BAL cultivables del tracto digestivo del lechón y su actividad

N de lechón	Región de tracto digestivo	Muestras iniciales recogidas	Variabilidad de las muestras				
			MRS + azul de amilina (0.012%)	Caracterización morfológica	Caracterización Bioquímica	Resistencia NaCl, Ph, sales Biliares	Pruebas de antagonismo
1	Estomago esof (EE)	6	6	6	6	6	
1	Estomago (E)	6	2	2	1	1	2
1	Duodeno (D)	2	4				
1	Yeyeuno (Y)	5	5				
1	Ileon (I)	4	4				
1	Ciego (C)	6	5	1	1	1	
2	Colon (Co)	6	6	1	1	1	
2	Estomago esof (EE)	3	3	4	4	4	2
2	Estomago (E)	3	1				
2	Duodeno (D)	4	4	3	3	1	
2	Yeyeuno (Y)	7	6	4	4	4	4
2	Ileon (I)	6	5	4	4	4	1
1	Ciego (C)	3	5	2	2	1	
2	Colon (Co)	13	11	4	4	1	
1	Total	35	32	9	9	9	2
2	Total	39	35	21	21	15	7

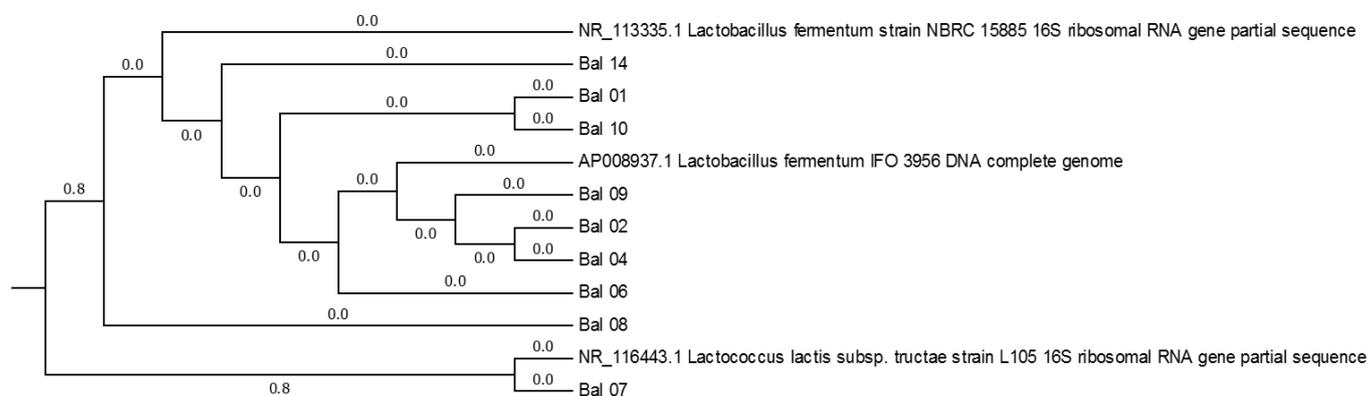
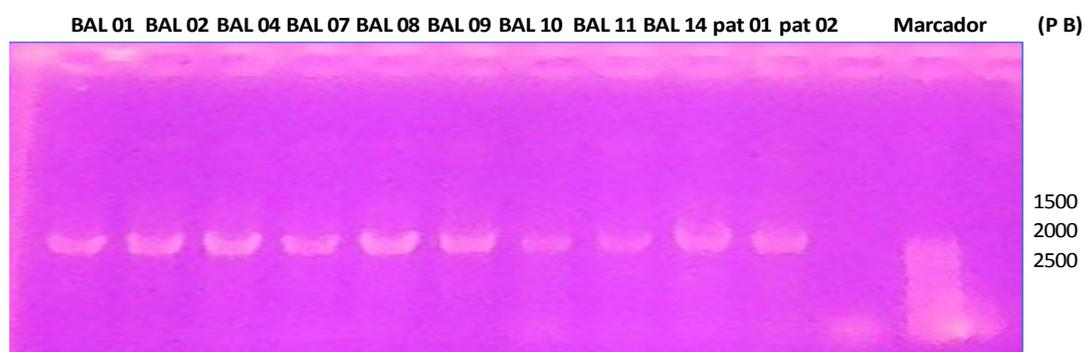
Tabla 2. Caracterización morfológica, bioquímica y pruebas de resistencia de las bacterias BAL seleccionadas

Clave	Muestra	Colonia	Colonia (mm)	Forma de colonia	Morfología bacteria	Coloración Gram	Prueba oxidasa	Prueba catalasa	Presencia de gas	Valor de pH	Presencia de esporas	pH ácido	Pruebas de resistencia							
													% Sales biliares			% NaCl			Ph	
													1	5	10	5	10	18	2,5	3,5
BAL 2	(E) Lechón	azul	Diminuta	redonda	bacilos	+	.	.	.	4,44	.	+	+	+	
BAL 6	(E) Lechón	azul	1	Plana	bacilos	+	.	.	.	3,75	.	+	+	+	
BAL 1	(E)	azul	1	Redonda	bacilos	+	.	.	.	4,88	.	+	+	+	
BAL 4	(E)	azul	1	Redonda	bacilos	+	.	.	.	4,68	.	+	+	+	
BAL 7	(Y)	azul	Diminuta	redonda	bacilos	+	.	.	.	4,29	.	+	+	+	
BAL 8	(Y)	azul	2	redonda	bacilos	+	.	.	.	4,24	.	+	+	+	
BAL 9	(Y)	azul	2	redonda	bacilos	+	.	.	+	5,25	.	+	+	+	
BAL 10	(Y)	azul	1	redonda	bacilos	+	.	.	.	5,74	.	+	+	
BAL 14	(I) Lechón7	azul	1	redonda	bacilos	+	.	.	.	4,81	.	+	+	

Tabla 3. Identificación molecular mediante el gen 16S ARNr de cepas bacterianas aisladas del tracto digestivo de lechón

Código	Extracción de muestra	Tamaño de la secuencia (pb)	Especie identificada	% de identidad	N° de accesión
BAL 2	Estómago	1503	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	99	AP008937.1
BAL 4	Estómago	1507			
BAL 6	Estómago	1499			
BAL 9	Estómago	1503			
BAL 1	Estómago	1494	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC	99	NR_113335.1
BAL 10	yeyuno	2110			
BAL 14	yeyuno	2138			
BAL 8	yeyuno	1932			
BAL 7	íleon	2461	<i>Lactococcus lactis</i>	94	NR_116443.1

Para mayor información sobre la referencia ingrese a: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> y digite el código de accesión de cada bacteria cultivable.

**Figura 6.** Árbol filogenético mostrando las relaciones de las bacterias ácido-lácticas aisladas del tracto digestivo del lechón.**Figura 7.** Gel de agarosa de electroforesis para verificación de ADN bacteriano.

Identificación molecular de las bacterias cultivables asociadas al tracto digestivo Para las cepas iguales Bal 02 (estómago) y Bal 04 (estómago), con Bal 06 (estómago) y Bal 09 (yeyuno) semejantes *Lacto-bacillus fermentum* IFO 3956 DNA,

con una identidad de 99% y cobertura de 99% de la secuencia nucleotídica y con una identidad de 90% y cobertura de 100% de la secuencia nucleotídica (PubMed National Center for Biotechnology, 2016).

GGCCATCCTTGATCGGATCATTGGGCGTAAGCGAGCGCAGGTGGTTTTTAAAGTTCTGATGTAAGGCGAGTGGCTCAACCATTGTGTGATTGGAACTGGGAGAGTTGAGTGCAGGAGAGGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATCGGTAGATATATGGAGGAACACCGGAGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAGTGTAGGGAGCTATAAGTTCCTGTAGCGCAGTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACAGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTCGAAGCAACGGGAAGAACCTTACCAGGCTTGTACATACTCGTGTATCCTTAGAGATAAGGAGTTCCTTCGGGACACGGGATACAGGTGGTGCATGGTGTGTCGTAGCTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTACTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACCTTAGTGTGAGACTGCCGGTATAAACCGGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACACGAGTGCACCAACCGCGAGGGTGCCTAACTCTTAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCACGGAAGTTGGGAGTACCCAAAGTAGGTTGCCTAACCGCAAGGAGGGCGCTTCTAAAGTAAGACCGATGACGGGGTGCATCACAAAAGGAGAAACACACACAGGGGGGGTGGTTGCCCGCCCTCTCGGGAGGAGAGCGGGGCCTC *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 DNA, complete genome. SOURCE *Lactobacillus fermentum* IFO 3956, *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus. REFERENCE 1 Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production AUTHORS Morita,H., Toh,H., Fukuda,S., Horikawa,H., Oshima,K., Suzuki,T., Murakami,M., Hisamatsu,S., Kato,Y., Takizawa,T., Fukuoka,H.,Yoshimura,T., Itoh,K., O'Sullivan,D.J., McKay,L.L., Ohno,H., Kikuchi,J., Masaoka,T. and Hattori,M. JURNAL DNA Res. 15 (3), 151-161 (2008) PUBMED 18487258. 2(bases 1 to 2098685) Direct Submission, AUTHORS Hattori,M., Yamashita,A., Toh,H., Oshima,K. and Shiba,T. Submitted (16-MAR-2005) Contact:Masahira Hattori University of Tokyo, Graduate School of Frontier Sciences; 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan (PubMed National Center for Biotechnology, 2016).

Las cepas bacterianas aisladas del tracto digestivo del lechón son parecidas entre Bal 01 (estómago) con Bal 10 (yeyuno), igual con Bal 14 (íleon) y todas semejantes con Bal 08 (yeyuno) estas fueron identificado como *Lactobacillus*

fermentum NBRC 15885 con una identidad de 99% y cobertura de 99% de la secuencia nucleotídica correspondiente. Bal 99% y cobertura de 77% (PubMed National Center for Biotechnology, 2016).

AGGATGAACGCGGGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCGTGGCCCAATTGATTGATGGTGTGCTTGCACCTGATTGATTTGGTCCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCAGAAGCGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACGTTGTTTCGATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGGGTTGATTAGCTTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGCGGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACC GCGTGAAGAGGGTTTCGGCTCAGTCTGTTGTTAAAGAAGAACCGTATGAGAGTAAGTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTACACGGCTAAGTCTGAGTGCAGGAGGAGGAGTGCAGGCGGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGAAGTCCATGTGTAGCGGTGAATGCGTAGATATATGAAGAACACAGTGGCGAAGGGCGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCA GTGCCGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAA GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTTGACATCTTGCGCCAACCTAGAGATAGGGCGT TTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA ACCCTTGTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTAGTGTGAGACTGCCGGTGCACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAG ATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGTACAATGGACGGTACAACGAGTCCGGAACCTCGGAGGGCAAGCAAATCTC TAAAACCGTTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCCGCTGCACGAAGTCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGG TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGAACACCCAAAGTCCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAG CCAGCCGCTAAGTGGGACAGATGATT. *Lactobacillus fermentum* strain NBRC 15885 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. SOURCE *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus fermentum*, Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus. Encontrados en estudios relacionados con organismos benéficos según los autores, REFERENCE 1 TITLE NITE Biological Resource Center (NBRC) AUTHORS Miyashita,M.Unpublished. 2(bases 1 to 1501) Direct Submission Submitted (23-APR-2014) National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA. 3(bases 1 to 1501) Direct Submission AUTHORS Miyashita,M. and Nakagawa,Y.Submitted (15-APR-2011) Contact:Mika Miyashita National Institute of Technology and Evaluation, NITE Biological Resource Center (NBRC); Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan (PubMed National Center for Biotechnology, 2016).

La Bal 07 (yeyuno lechón 02) encuentra alta semejanza con la bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *tractae* strain L105 16S ribosomal RNA con una identidad de

99% y cobertura de 99% de la secuencia nucleotídica correspondientes: (PubMed National Center for Biotechnology, 2016).

CGGAGTGCAGGGGTTCAATAGGGCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCCCCGAAAGTTGCATCAGAACTGTTNGAACTTGAGTGCN AAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGGCGCTCTCTGGTCTG CAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTG TTGGGAGGTTTCCGCTCTCAGTGTCTGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCCGAAGGTTGAAACTCAAAGG AATTGACGGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTG CAAACCTAAGAGATTAGGTGTTCCCTTCGGGGACGCTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGG TTAAGTCCCGCAAGGAGCGCAACCCTTGTCTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAA CCTGCGAAGGCAAGCGGATCTCTTAAAGNCGTTCTCAGTTCGGACTGAGGCTGCAACTCANNCTACACGAAGCTGGAATCGTAGT AATCGCGGATCAGCACGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGCTAACACCATGAGAGTCTGTAACNCCN AANCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTACGCGTCTAAGGTAGGACAAATGATTAGGTGAAAGTTCGTTAACAAGGTAACCCGNA A *Lactococcus lactis* subsp. *tractae* Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae; Lactococcus. REFERENCE 1(bases 1 to 1541) *Lactococcus lactis* subsp. *tractae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) AUTHORS Perez,T., Balcazar,J.L., Peix,A., Valverde,A., Velazquez,E., de Blas,I. and Ruiz-Zarzuela,I. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61 (PT 8), 1894-1898 (2011) PUBMED 20833888. 2 (bases 1 to 1541) Direct Submission CONSRM NCBI RefSeq Targeted Loci Project Submitted (23-APR-2014) National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA. 3(bases 1 to 1541) Direct Submission. AUTHORS Balcazar,J.L., Peix,A., Velazquez,E., de Blas,I. and Ruiz-Zarzuela,I. Submitted (29-MAY-2008) Microbiologia y Genetica, Universidad de Salamanca, Doctores de la Reina s/n, Salamanca 37007, Spain (PubMed National Center for Biotechnology, 2016)

DISCUSIÓN

En busca de bacterias ácido lácticas del tracto digestivo del lechón recién destetado, nos basándonos en el benéfico de los microorganismos naturales benéficos en el tracto digestivo del lechón (Álvarez, 2004; Figuero y Sánchez, 2016; Bertullo, 2001; Lessi, 1994; García et al., 2012; Partanen y Mroz, 1999; Buhnik-Rosenblau et al., 2012) La microbiota nativa tiene efectos benéficos (Guarner et al., 2008; Zhang et al., 2011; Borrueal 2007), Podemos dar cuenta de organismos beneficiosos que encontramos en el tracto digestivo del lechón según Metzler y Mosenthin, 2009; Kim et al., 2012; Konstantinov et al., 2008; Pieper et al., 2006.

De los microorganismos naturales con capacidad benéficas que se encuentran como bacterias cultivables naturales del tracto digestivo del lechón fueron diferenciadas 67 cultivables, inicialmente identificadas como bacterias ácido lácticas semejante a los reportados por Jurado et al., 2013; Rosmini et al., 2004; Sánchez et al., 2015; Cranwell, 1985; Álvarez, 2004; Sánchez y Ochoa, 2016; Bertullo, 2001; Lessi, 1994; García et al.,

2012; Partanen y Mroz, 1999; Buhnik-Rosenblau et al., 2012, tanto el *Lactobacillus fermentus* y *Lactococcus lactis* pertenecen al orden *Lactobacillales* a l igual a los encontrados para mejorar la producción de cerdos como son los *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *B. licheniformis* y *B. subtilis* (Bavera et al., 2002; Gatti, 2013; Carro y Ranillas, 2002; Agudelo, 2014; Pérez, 2007; Guerra, 2005; Metzler y Mosenthin, 2009; Blajman et al., 2015; Pluske, 2013; Konstantinov et al., 2008; Meng et al., 2010). Los cuales como producto metabolismo producen sustancias con pH bajo de 3.5 a 5.7 como ácidos láctico según reportadas por (Pérez et al., 2007; Samaniego, 2000; Rosmini et al., 2004; Gebert et al., 2011; Gardiner et al., 2004).

Las bacterias encontradas e identificadas mulecamente como el *Lactobacillus fermentus* y *lactococcus lactis*, son utilizados como probiótico en la alimentación animal, específicamente lo manifiesta Elizete (2000) utilizó el *Lactobacillus fermentus* como probiótico de pollos y en cerdos se utilizó como probiótico

lactobacillus fermentus, *lactobacilos lácticos*, *bacillus firmus* y *lactobacillus saerimneri* reportados por García *et al.*, 2012; Partanen y Mroz, 1999; Buhnik-Rosenblau *et al.*, 2012; NCBI, 2016.

Considerando que, para ser seleccionada como bacterias benéficas apropiadas para el lechón, tienen que haber pasado las pruebas bioquímicas, de resistencia y de antagonismo como parte de selección de nuestro trabajo las cepas *Lactobacillus fermentos* y *lactococcus lactis*, como los reportados por los autores García *et al.*, 2012; Partanen y Mroz, 1999; Buhnik-Rosenblau *et al.*, 2012; NCBI, 2016.

Este tipo de bacterias encontrada se le conoce como BAL cuya acidez está por debajo de 4.5 y tienen un efecto bactericida (Frizzo *et al.*, 2011; Gebert *et al.*, 2011; Gardiner *et al.*, 2004). Identificando molecularmente bacterias como *lactobacillus fermentus*, *lactobacilos lácticos*, *bacillus firmus* y *lactobacillus saerimneri* reportados de uso como probióticos (Álvarez, 2004; Figuero y Sánchez, 2016; Bertullo, 2001; Lessi, 1994; García *et al.*, 2012; Partanen y Mroz, 1999; Buhnik-Rosenblau *et al.*, 2012; NCBI, 2016) que enfrentadas a patógenos propios del cerdo produciendo halos de inhibición (Nodarse, 1998).

Conclusiones

Se aislaron 35 bacterias nativas cultivables y 2 de acción patógena, asociadas al tracto digestivo del lechón pos destetado. Se encontraron 23 bacterias según caracterizaron bioquímicamente con capacidad probiótica cultivables consideradas como BAL de efecto benéfico, asociadas al tracto digestivo del lechón pos destetado. Se

identificaron y caracterizaron molecularmente 15 bacterias BAL asociadas al tracto digestivo del lechón pos destetado. De las bacterias caracterizadas molecularmente ocho tienen una región en común según el gen 16s ARN que coinciden con diferentes cepas *lactobacillus fermentus* y *lactococcus lactis*.

Referencias Bibliográficas

- Agudelo, L.N. 2014. Estado del arte de la obtención de bacteriocinas a partir de bacterias ácido láctico y su aplicación en la industria de alimentos. Tesis doctoral. Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, Colombia.
- Alfaro, A.R.; Guevara, M.; Gonzales, I. 2010. Prevalencia y distribución de los principales agentes etiológicos que afectan los langostinos silvestres en Tumbes, Perú. *Rev. Perú biol.* 17(3): 359-364.
- Álvarez, J. 2004. Evaluación de diferentes dosis de un preparado biológico de bacterias lácticas en cerdos en ceba. *Revista Electrónica de Veterinaria Redvet* 6: 1695-7504.
- Bavera, G.; Bocco, O.; Beguet H.; Petryna, A. 2002. Promotores Del Crecimiento Y Modificadores Del Metabolismo. Cursos de Producción Bovina de Carne, F.A.V. UNRC. www.produccion-animal.com.ar
- Bertullo, E. 2001. Tecnología de los productos de la pesca: Guía de trabajos prácticos, Universidad de la República Uruguay: Facultad de Veterinaria. Instituto de Investigaciones Pesqueras: Montevideo, Uruguay.
- Blajman, J.; Zbrun, M.; Astesana, D.; Berisvil, A.; Romero S.A.; Fusari, M.; Soto, L. 2015. Probióticos en pollos parrilleros: una estrategia para los modelos productivos intensivos. *Rev Argent Microbiol* 47: 360-367.
- Borrueal, N. 2007. Probióticos y prebióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal gastroenterología y patología. Hospital de la Vall d'Hebron. Barcelona, España.
- Buhnik-Rosenblau, K.; Matsko-Efimov, V.; Jung, M.; Shin, H.; Danin-Poleg, Y.; Kashi, Y. 2012. Indication for co-evolution of *Lactobacillus johnsonii* with its host. *BMC Microbiology* 12: 149.

- Cadillo, J. 2008. Producción de porcinos. Talleres gráficos Juan Gutember, Lima Perú.
- Carro, M.; Ranillas, M. 2002. Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales: situación actual y posibles alternativas. Departamento de Producción Animal I, Universidad de León, España. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar
- Cranwell, P. 1985. The development of acid and pepsin secretory capacity in the pig; the effects of age and weaning. *British Journal of Nutrition* 54: 305-320.
- Cueto-Vigil, M.; Acuña-Monsalve, Y.; Valenzuela-Riaño, J. 2010. Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido-lácticas aisladas del suero costeño. *Actualidades Biológicas* 32: 129-138.
- Dulanto, G. 2013. Identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociados con el cultivo de langostino blanco *Litopenaeus vannamei* por amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). Tesis EAP Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Figuero, V.; Sánchez, M. 2016. Tratamiento y utilización de residuos de origen animal, pesqueros y alimenticios en la alimentación animal, Taller regional Instituto de Investigación Porcina IISN-1014-1200, FAO producción y sanidad animal, 134, IIP y la FAO, 8 de septiembre de 1994. La Habana, Cuba.
- Frizzo, L.; Soto, L.; Zbrun, M.; Signorini, M.; Bertozzi, E.; Sequeira, G.; Rodriguez A.R.; Rosmini, M. 2011. Effect of lactic acid bacteria and lactose on growth performance and intestinal microbial balance of artificially reared calves. *Livestock Sci* 140: 246-52.
- García, M.; Lopez, Y.; Carcasses, A. 2012. Empleo de probióticos en los animales. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar
- Gardiner, G.; Casey, P.; Casey, G.; Lynch, P.; Lawlor, P.; Hill, C.; Fitzgerald, G. 2004. Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 70: 1895-1906.
- Gatti, M. 2013. Cerdos Criados Con Antibióticos: Un Peligro Para La Salud Humana 2013. *Universo Porcino*. Investigación y desarrollo. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar
- Gebert, S.; Davis, E.; Rehberger, T.; Maxwell C. 2011. *Lactobacillus brevis* strain 1E1 administered to piglets through milk supplementation prior to weaning maintains intestinal integrity after the weaning event. *Benef Microbes* 2(1): 35-45.
- Guerra, N.; Torrado, A.; Lopez, C.; Pastrana L. 2005. Modelling the fed-batch production of pediocin using mussel-processing wastes. *Process Biochemistry* 40: 1071-1083
- Guarner, F.; Khan, A.; Garisch, J. 2008. Equipo de Revisión. Guías prácticas: probióticos y prebióticos. Organización Mundial de Gastroenterología.
- Jurado, H.; Aguirre, D.; Ramírez, C. 2009. Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. *Revista MVZ Córdoba* 14(2): 1723-1735.
- Kim, B.; Cho, M.; Kim, M.; Choi, H.; Kang, M.; Shim, H.; Ahn, T.; Kim, J.; Park, D. 2012. Rapid and specific detection of *Burkholderia glumae* in rice seed by real-time Bio-PCR using species-specific primers based on an *rhs* family gene. *Plant Disease Journal* 96: 577-580.
- Konstantinov, S.; Smidt, H.; Akkermans, A.; Casini, L.; Trevisi, P.; Mazzoni, M.; De Filippi, S. 2008. Feeding of *Lactobacillus sobrius* reduces *Escherichia coli* F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets. *FEMS Microbiology Ecology* 66: 599-607.
- Konstantinov, S.R.; Awati, A.A.; Williams, B.A.; Miller, B.G.; Jones, P.; Stokes, C.R.; De Vos, W.M. 2006. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environmental microbiology* 8(7): 1191-1199.
- Lessi, E. 1994. Ensilaje de pescado en Brasil para la alimentación Animal. Capítulo 3. Brasil. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/APH134/cap3.htm>.
- Meng, Q.W.; Yan, L.; Ao, X.; Zhou, T.X.; Wang, J.P.; Lee, J.H.; Kim, I.H. 2010. Influence of probiotics in different energy and nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, and blood characteristics in growing-finishing pigs. *Journal of animal science* 88(10): 3320-3326.
- Metzler, B. 2010. Nonstarch polysaccharides modulate bacterial microbiota, pathways

- for butyrate production, and abundance of pathogenic *Escherichia coli* in the pig gastrointestinal tract. *Applied Environmental Microbiology* 76: 3692-3701.
- Metzler, B.; Mosenthin, R. 2009. Efecto de los ácidos orgánicos en el crecimiento, performance y digestibilidad de nutrientes en lechones. En: *Acidificantes en la nutrición animal*. Institute of Animal Nutrition, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany, Nottingham University Press.
- National Center for Biotechnology Information. 2015. Database resources of National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* 43: D6-D17.
- Nodarse, H. 1998. Valoración in vitro de discos para antibiogramas de producción nacional 1998 Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto" *Revista Cubana Medicina Militar* 27(2): 106-112.
- Partanen, K., Mroz, Z. 1999. Organic acid for performance enhancement in pig diets. *Nutrition Research Reviews* 12: 117-145.
- Perez, N.; Fajardo, P.; Méndez, J.; Cachaldora, P.; Pastrana, L. 2007. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Alimentation Animal Ciencia y Tecnología* 134: 89-107.
- Pieper, R.; Janczyk, P.; Schumann, R.; Souffrant, W.B. 2006. The intestinal microflora of piglets around weaning with emphasis on lactobacilli. *Archiva Zootechnia* 9: 28-40.
- Pluske, J. 2013. Feed - and feed additives - related aspects of gut health and development in weanling pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 4: 1.
- Ramírez, L.; Castaño, D. 2009. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica* 42: 263-268.
- Rosmini, M.; Sequeira, G.; Guerrero, I.; Martí, L.; Dalla, R.; Frizzo, L.; Bonazza, L. 2004. Producción de prebióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 3: 181-191.
- Samaniego, L.; Sosa M. 2000. *Lactobacillus* spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Editorial Universitaria del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba. Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. Centro de Estudios Biotecnológicos, Facultad de Agronomía. Ciudad de Matanzas, Cuba.
- Sánchez, H.; Ochoa, G. 2016. Producción y valoración de alimentos para animales monogástricos, con ensilado biológico de restos del procesamiento de langostino (*Litopenaeus vannamei*) fermentados con lactobacilos. *Scientia Agropecuaria* 7: 181-189.
- Sánchez, H.; Benites, E.; Ubillus, E.; Ochoa, G. 2015. Efecto de tres niveles de ensilado biológico de cabeza de *Penaeus*, en alimentación de cerdos (*Sus scrofa*) en las etapas fisiológicas de gestación y lactación. *Manglar* 10(2): 27-38.
- Vélez, J. 2014. Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias probióticas extraídas del calostro de cerdas de granjas del Aburrá sur, Tesis de Magister en Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias, Medellín, Colombia.
- Zhang, L.; Jahng, D. 2012. Long-term anaerobic digestion of food waste stabilized by trace elements. *Waste Management* 32(8): 1509-1515.