

Estudio del ecosistema bacteriano del tracto digestivo del cerdo
mediante técnicas moleculares

Mercè Roca Canudas



CReSA
Centre de Recerca en Sanitat Animal

Universitat Autònoma de Barcelona

***Estudio del ecosistema bacteriano del tracto digestivo del cerdo
mediante técnicas moleculares***

TESI DOCTORAL PRESENTADA PER **MERCÈ ROCA I CANUDAS**

PER ACCEDIR AL GRAU DE DOCTORA EN VETERINÀRIA
DINS DEL PROGRAMA DE DOCTORAT DE MEDICINA I SANITAT ANIMALS,
DE LA FACULTAT DE VETERINÀRIA DE LA UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA,
SOTA LA DIRECCIÓ DE LA DRA. NATÀLIA MAJÓ I MASFERRER I
EL DR. IGNACIO BADIOLA I SÁIZ

Bellaterra, 2008



FACULTAT DE VETERINÀRIA DE BARCELONA

NATÀLIA MAJÓ I MASFERRER, professora titular del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona.

IGNACIO BADIOLA I SÁIZ, investigador de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària.

Certifiquen:

Que la memòria titulada, “**Estudio del ecosistema bacteriano del tracto digestivo del cerdo mediante técnicas moleculares** ” presentada per Mercè Roca i Canudas per optar al grau de Doctora en Veterinària, ha estat realitzada sota la nostra direcció i, considerant-la acabada, autoritzen la seva presentació per tal de ser jutjada per la comissió corresponent.

I perquè consti als efectes oportuns, signen els presents a Bellaterra, a 7 de Juliol de 2008.

Dra Natàlia Majó Masferrer

Dr Ignacio Badiola Sáiz

La realització de la present tesi doctoral ha estat possible gràcies al finançament del projecte CICYT AGL2001-2621-C02-01. L'autora va rebre una beca del Ministerio de Ciencia y Tecnología per realitzar aquest estudi.

AGRAÏMENTS

Sense cap dubte us puc dir, que el millor de fer aquesta tesi han estat les persones que he conegut pel camí. Durant tot aquest període us he anat coneixent i us puc dir que només per això ja ha valgut la pena!!. Gràcies a tots pel vostre esforç i participació.

En primer lloc, vull donar les gràcies als meus directors de tesi: a la Natàlia Majó i a l'Ignacio Badiola. A tu Natàlia, t'agraeixo l'oportunitat que em vas donar per poder fer el doctorat. També el teu suport constant, ja que sense tu, avui no estaria aquí. A tu Ignacio, també et voldria donar a les gràcies per l'ajuda i el coneixement que m'has aportat durant tots aquests anys. Gràcies als dos per tot l'esforç.

Voldria també donar les gràcies a en Miquel Nofrarías, per tota la teva ajuda, per revisar la tesi i per ser sempre tan optimista. A la Marisol Castillo per les estones compartides (que en són unes quantes) comparant resultats i ajudar-me a entendre millor la composició de l'ecosistema bacterià del tracte digestiu. A la Montse Anguita per tenir sempre un moment per mi (a Sant Julià, tornant de Lleida, a Rupit o on faci falta...). A tots tres dir-vos que heu estat molt més que uns bons companys de tesi!!!.

Tanmateix, també vull donar les gràcies a tots aquells amb qui hem compartit part d'aquest projecte: la gent del departament de Nutrició. A la Susana Martin, a l'Edgar Garcia, a en Franciso Pérez, i en Josep Gasa. També a les persones amb qui vaig treballar inicialment al Laboratori de la Zona Franca i després al CReSA: a l' Ana Pérez de Rozas, gràcies per saber compartir amb mi d'una forma planera tots els detalls de la PCR-RFLP, a la Marta, a la Noelia, a la Núria, a la Judit i a en Joan Pujols.

També vull agrair la col·laboració a tot el personal del CReSA, començant per en Mariano i seguint per en Quim i la Maria (els meus directors de tesina). Al CReSA he conegut moltes més persones excepcionals com la Roser Dolz (inseparables), l'Àlex Olvera (l'amic de les 1000 aventures) i la Maria Fort (la petita del grup), en Llorenç (l'alegria de la "huerta"), en Sergio (amb qui vaig començar el meu primer dia al CReSA), la Marina (tot cor) i al mestre Humberto ...També a la Virginia, a la Marta, a la Nilsa, a la Jennifer, a l'Anna Alba, a la Bibiana, a la Sonia, a en Xavier, a la Lana, a

en Fernando, a l'Enric Mateu, a la Merche, a l'Eva Huerta, a la Raquel, a la Mónica, al Lorenzo, a l'Eva Pérez, a en Jordi, a en Nitu, a en Victor, a la Rosa, a l'Enric Vidal, a l'Alberto, a l'Ivan i un llarg...També a tots els que us he conegut més cap al final: a l'alegre Meritxell, la Núria Busquets i a la Laura de Navàs.

Vull donar les gràcies al personal de l'estabulari del CReSA amb qui he compartit bons moments: a en David, a l'Ivan, a la Maria Ángeles i com no a en Valentí.

Voldria dedicar també unes línies a la gent del departament d'Anatomia Patològica, que ens va acollir durant les primeres etapes del CReSA. A l'Alberto, a la Mar, a la Blanca, a en Toni, a la Rosa, a l'Albert, a la Gabriela, a l'Ana Resendes, a en Raül, a la Carme i a l'Hugo...gràcies.

I would like to thank to the Gut microbiology and Immunology division of the Rowett Research Institut, in particular to Sylvia Duncan, Álvaro Belenguer and Alan Walker for introduce me in the FISH adventure and to give me the oportunity to know Scotland!!!. Thanks a lot.

Els meus dos últims anys de tesi els he compartit de forma indirecte amb tot el personal de l'estabulari d'Hipra. Ricard, et vull agrair les facilitats que m'has donat per poder acabar aquest treball i la manera que tens d'encoratjar-nos cada dia. També a la resta de l'equip: a la Marta (he fet sort en conèixer-te), a en Rafa, a en Xevi, a en Joan, a en Jordi, a l'Esperança, a l'Ariadna, a l'Oriol, a en Carles i als veïns de coccídies.

No hi podia faltar donar les gràcies a les amigues de tota la vida. A les que tinc des de que érem petites. A la Marta i en Moi, a les Cristines (quin parell!!), a la Merceneta, a l'Anna, a la Montse, a la Christelle, a l'Ester i a la To. Gràcies per escoltar les meves trifulgues i pels ànims que sempre m'heu donat.

També vull donar les gràcies pels bons moments passats a tota la colla de Rupit: a la Kris, a la Marta i en Peyo, a l'Eva i en Massoti, a en Portal (el cosinet adoptat), a en Gaspanet, a en Kelerrin, a en Lluís i la Gemma, a en Cayot i la Susagna, a la Mariona, l'Albert, i en Grau, a l'Anna i en Toni, a la Marta i en Tin, a la Sílvia i en Marc, a en Tupa i la Rosa, a l'Irene i a l'Abril. També als petits que vindran, la Martina, la Berta i en Jan.

Un racó l'he guardat per als amics que vaig fer durant la carrera. Perquè sé que encara que passi el temps sempre serem amics/amigues: A la Montse, a l'Anna Robert, a la Bet, a l'Anna Subirós, a la Bea i a en Toni.

A la meva segona família, la que tinc a Rupit. A en Met (a qui de ben segur avui li hagués agradat estar aquí), a la Montserrat (per ser un sol), a la Maria, a la Judit, a en Marc, a la Dolors i a en Joan de Can Portal. I no em puc oblidar de donar les gràcies a les petites de la casa: a la Queralt i Aïna, per fer-nos riure.

I ja per acabar, vull donar gràcies i dedicar aquesta tesi a tots els de casa. Donar les gràcies a les meves super tietes: la Dolors i la Pepita. Als meus germans, en Josep (perquè sé que m'estimes), a la Montse i a en Jordi (perquè sempre hi sou) i a en Ramon i a l'Ester (pels ànims que sempre m'heu donat i a tu Ester, pel disseny de la portada). També al petit de l'Oleguer, per l'alegria que ens dones a tots, i com no als meus pares, en Ramon i la Mercè. Vosaltres em vau convèncer per començar aquesta tesi i encara que he tingut moments de tot, us puc dir que no me'n penedeixo!!! Moltes gràcies per ensenyar-nos a anar sempre endavant.

I a tu, Albert, et guardo el millor tros, com l'últim tros del millor pastís. Gràcies pels sis anys que hem compartit. Ens vam conèixer quan estava apunt de començar aquesta tesi i ara junts hem arribat al final. Gràcies per sempre fer-me costat.

En los últimos años, para mejorar el estatus sanitario de las granjas, se han realizado muchos avances en la producción porcina. Sin embargo, actualmente todavía se observan problemas digestivos sobretodo durante la fase del destete de los lechones y en la entrada de la fase del engorde. Además, la prohibición del uso de los antibióticos como promotores de crecimiento ha hecho que incrementara el interés por encontrar alternativas que puedan ayudarnos a controlar esta problemática digestiva.

Este trabajo tiene como objetivo principal estudiar, mediante diferentes técnicas de biología molecular, la composición de la microbiota del tracto digestivo de los cerdos y los cambios que en ella se producen en diferentes condiciones.

En el primer capítulo, se estudiaron las poblaciones bacterianas del tracto gastrointestinal en cerdos recién destetados y alimentados con piensos suplementados con diferentes aditivos (un acidificante, un extracto de plantas y un antibiótico), mediante la utilización de la técnica del polimorfismo de la longitud de los diferentes fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Mediante la utilización de esta técnica, se detectaron cambios en la complejidad de las poblaciones bacterianas a lo largo del tracto digestivo, incrementando de forma significativa de los tramos proximales a los tramos más distales. A partir de estos resultados, se sugirió que para estudios de diversidad microbiana del tracto digestivo de los cerdos, el análisis del yeyuno/íleon y del ciego/colon serían muestras suficientes para un estudio representativo. Además se observó que mediante la incorporación del butirato de sodio, se incrementaba la diversidad bacteriana de los tramos distales del tracto digestivo, mientras que la incorporación del extracto de plantas la disminuía.

En el segundo capítulo, se estudió el efecto de diferentes tipos de fibra sobre la microbiota intestinal, en este caso utilizando diferentes técnicas moleculares (PCR-RFLP, PCR cuantitativa y FISH). Además, también se estudió la adaptación de la misma a lo largo del tiempo. En este estudio, se observó que el tipo de fibra modificaba la composición de la microbiota intestinal y que el tiempo de adaptación de la microbiota del tracto digestivo era variable en función del tipo de sustrato utilizado. Así, mientras que la introducción del maíz molturado grosero indujo un incremento súbito y transitorio de la diversidad microbiana en los tramos del tracto digestivo más

proximales, la introducción de salvado de trigo provocó una disminución tardía de la diversidad bacteriana en tramos digestivos más distales.

Finalmente, en el tercer capítulo se analizó la dinámica de infección de los cerdos con dos cepas diferentes de *Salmonella* Typhimurium, estudiando también el efecto de la infección sobre la diversidad microbiana del tracto digestivo. A pesar de que la sintomatología fue muy leve, globalmente se demostró que los animales infectados con una cepa resistente a múltiples antibióticos presentaban una mayor alteración de los parámetros productivos y de los síntomas clínicos que los animales infectados con una cepa sensible a diferentes antibióticos. La infección no modificó el grado de diversidad microbiana de las heces ni del contenido del ciego de ninguno de los animales.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1. Microbiota del tracto digestivo.....	2
1.1.1. Evolución de las poblaciones microbianas del tracto digestivo.....	2
1.1.2. Composición de la microbiota en cerdos adultos.....	6
1.1.3. Efectos de la microbiota.....	9
1.1.3.1. Efecto de la microbiota sobre la morfología intestinal.....	10
1.1.3.2. Efecto de la microbiota sobre parámetros bioquímicos y fisiológicos del tracto gastrointestinal.....	10
1.1.3.3. Efecto de la microbiota sobre el sistema inmunitario.....	11
1.2. Componentes principales de la dieta y su efecto sobre la microbiota del tracto digestivo.....	12
1.2.1. Macronutrientes.....	13
1.2.1.1. Componentes nitrogenados: Proteínas y aminoácidos.....	13
1.2.1.2. Lípidos.....	14
1.2.1.3. Carbohidratos.....	15
1.2.2. Micronutrientes.....	20
1.2.2.1. Probióticos.....	20
1.2.2.2. Prebióticos.....	22
1.2.2.3. Acidificantes.....	23
1.2.2.4. Extractos de plantas.....	25
1.2.2.5. Minerales.....	27
1.2.2.6. Otros.....	28
1.3. Técnicas de caracterización de la microbiota gastrointestinal.....	28
1.3.1. Métodos directos.....	28
1.3.1.1. Cultivos y pruebas bioquímicas.....	29
1.3.1.2. Métodos moleculares.....	29
1.3.1.2.1. Métodos moleculares cualitativos.....	30
1.3.1.2.1.1. Clonaje y secuenciación.....	30
1.3.1.2.1.2. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) o de los fragmentos terminales de restricción (PCR-tRFLP).....	31

1.3.1.2.1.3. <i>Gradiente de desnaturalización (DGGE) o gradiente de temperatura (TGGE) del gel de electroforesis</i>	33
1.3.1.2.1.4. <i>Análisis de la diversidad microbiana y generación de los dendrogramas</i>	34
1.3.1.2.2. <i>Métodos moleculares cuantitativos</i>	35
1.3.1.2.2.1. <i>Hibridación in situ fluorescente (FISH)</i>	35
1.3.1.2.2.2. <i>PCR cuantitativa a tiempo real</i>	36
1.3.2. Métodos indirectos	37
1.3.2.1. <i>Ácidos grasos volátiles (AGVs)</i>	38
1.3.2.2. <i>Bases púricas</i>	38
1.3.2.3. <i>Actividades enzimáticas</i>	38
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	41
CAPÍTULO 3. CAMBIOS EN LAS POBLACIONES BACTERIANAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL EN CERDOS RECIEN DESTETADOS Y ALIMENTADOS CON PIENSOS SUPLEMENTADOS CON DIFERENTES ADITIVOS	43
3.1. Introducción	44
3.2. Materiales y métodos	45
3.2.1. <i>Animales, alojamiento y manejo</i>	45
3.2.2. <i>Dietas y diseño experimental</i>	46
3.2.3. <i>Controles y toma de muestras</i>	46
3.2.4. <i>Procesado de las muestras</i>	48
3.2.4.1. <i>Extracción del ADN y técnica de PCR</i>	48
3.2.4.2. <i>Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)</i>	48
3.2.4.3. <i>Análisis de los fragmentos de restricción</i>	49
3.2.5. <i>Análisis estadístico</i>	50
3.3. Resultados	51
3.3.1. <i>Parámetros clínicos y productivos</i>	51
3.3.2. <i>Diversidad bacteriana</i>	51
3.3.2.1. <i>Número de bandas obtenidas mediante PCR-RFLP</i>	51
3.3.2.2. <i>Índice de Shannon –Weaver en el yeyuno distal y colon proximal</i>	53

3.3.3. Similitud bacteriana	54
3.4. Discusión	61
CAPÍTULO 4. RESPUESTA ADAPTATIVA DE LA MICROBIOTA DEL TRACTO DIGESTIVO FRENTE A DIFERENTES FUENTES DE FIBRA EN CERDOS DE ENGRODE	67
4.1. Introducción	68
4.2. Materiales y métodos	69
4.2.1. Animales, alojamiento y manejo	69
4.2.2. Dietas y diseño experimental	70
4.2.3. Controles y toma de muestras	72
4.2.4. Procesado de las muestras	73
4.2.4.1. Extracción del ADN y técnica de PCR.....	73
4.2.4.2. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)..	73
4.2.4.3. Análisis de los fragmentos de restricción.....	74
4.2.4.4. Reacción de la cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).....	74
4.2.4.5. Análisis de las bases púricas.....	75
4.2.4.6. Hibridación in situ fluorescente (FISH).....	75
4.2.5. Análisis estadístico	75
4.3. Resultados	76
4.3.1. Parámetros clínicos y productivos	76
4.3.2. Diversidad bacteriana	77
4.3.2.1. Número de bandas obtenidas mediante PCR-RFLP.....	77
4.3.2.2. Índice de Shannon – Weaver en el yeyuno distal y en el colon proximal.....	81
4.3.3. Similitud bacteriana	82
4.3.4. Cuantificación de las poblaciones de lactobacilos y enterobacterias mediante PCR cuantitativa	87
4.3.5. Cuantificación de los lactobacilos y los estreptococos del tracto gastrointestinal mediante la técnica del FISH	89
4.3.6. Análisis de las bases púricas	90
4.4. Discusión	91

CAPÍTULO 5. INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON DOS CEPAS DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SEROVAR TYPHIMURIUM EN CERDOS.....	97
5.1. Introducción.....	98
5.2. Materiales y métodos.....	98
5.2.1. Animales, alojamiento y manejo.....	98
5.2.2. Infección experimental.....	99
5.2.3. Controles y toma de muestras.....	100
5.2.4. Procesado de las muestras.....	100
5.2.4.1. <i>Extracción del ADN y técnica de PCR.....</i>	<i>100</i>
5.2.4.2. <i>Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).....</i>	<i>101</i>
5.2.4.3. <i>Análisis de los fragmentos de restricción.....</i>	<i>102</i>
5.2.4.4. <i>Cultivos bacterianos.....</i>	<i>102</i>
5.2.4.5. <i>Detección de anticuerpos frente a Salmonella spp.....</i>	<i>103</i>
5.2.4.6. <i>Estudio anatomopatológico.....</i>	<i>103</i>
5.2.5. Análisis estadístico.....	103
5.3. Resultados.....	104
5.3.1. Parámetros clínicos y productivos.....	104
5.3.2. Detección de anticuerpos frente a Salmonella spp.....	105
5.3.3. Excreción fecal y translocación.....	106
5.3.4. Diversidad bacteriana.....	106
5.3.4.1. <i>Número de bandas obtenidas mediante PCR-RFLP.....</i>	<i>106</i>
5.3.4.2. <i>Índice de Shannon – Weaver en el ciego y en el recto.....</i>	<i>107</i>
5.4. Discusión.....	108
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN GENERAL.....	113
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES.....	121
CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA.....	125

ABREVIATURAS

AB	dieta con 0,04 % de avilamicina (experimento I)
AC	dieta con 0,3 % de butirato sodio (experimento I)
ACSSuT	ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfamidas y tetraciclinas
ADG	<i>average daily gain</i> : ganancia media diaria
ADN	ácido desoxidoribonucleico
AGP	<i>antibiotic growth promoter</i> : antibiótico promotor del crecimiento
AGVs	ácidos grasos volátiles
Bp	pares de bases
BSA	albúmina sérica bovina
C	ciego
CD	colon distal
CP	colon proximal
CT	dieta control (experimento I y II)
DGGE	<i>denaturant gradient gel electrophoresis</i> : gel de electroforesis con gradiente denaturalizante
DM	distancia de manhattan
EEM	error estandar de la media
FISH	hibridación <i>in situ</i> fluorescente
G:C	ganancia:consumo
GLM	modelos lineales generalizados
GRO	dieta con molturación grosera del maíz (experimento II)
H'	índice de diversidad (Shannon – Weaver)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> : cromatografía líquida de alta resolución
I	íleon
LT	harina de pescado <i>low temperature</i> : baja temperatura
MS	materia seca
PB	concentración de las bases púricas
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> : tampón fosfato salino
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> : reacción de la cadena de la polimerasa
PI	post infección
Pi	probabilidad de encontrar una determinada banda en un carril

PNAs	polisacáridos no amiloideos
PUL	dieta con pulpa de remolacha (experimento II)
R	recto
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i> : polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción
SAC	sacrificio
SAL	dieta con salvado de trigo (experimento II)
ST	estómago
ST-R	<i>Salmonella</i> Typhimurium cepa resistente a múltiples antibióticos
ST-S	<i>Salmonella</i> Typhimurium cepa sensible a múltiples antibióticos
TGGE	<i>temperature gradient gel</i> : gel electroforesis con gradiente de temperatura
t-RFLP	<i>terminal restriction fragment length polymorphism</i> : polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción terminales
UFC	unidades formadoras de colonias
UV	ultravioletas
XT	dieta con 0,03 % de una mezcla de extractos de plantas (experimento I)
YD	yeyuno distal
YP	yeyuno proximal

CAPÍTULO 1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. MICROBIOTA DEL TRACTO DIGESTIVO

1.1.1. Evolución de las poblaciones microbianas del tracto digestivo

La microbiota del tracto digestivo de los animales está compuesta por centenares de microorganismos diferentes. No obstante, este órgano permanece estéril hasta el nacimiento y es durante el parto cuando empieza el proceso de colonización. El proceso de colonización es complejo y depende de diferentes factores como la especie animal, la edad del animal, la dieta que recibe, el método de nacimiento o el ambiente en el que se encuentran (Mackie *et al.*, 1999; Savage, 1999).

En el ganado porcino, se puede afirmar que la colonización del tracto gastrointestinal se produce en un período corto de tiempo, siendo posible detectar determinados géneros bacterianos durante las tres primeras horas de vida (Swords *et al.*, 1993). Asimismo, en un estudio realizado por Katouli y colaboradores (1997), los autores demostraron una gran similitud entre la microbiota del tracto digestivo de la cerda y la de su descendencia al tercer día de vida. Además, Tannock y colaboradores (1990) demostraron que las poblaciones de Lactobacilos presentes en las heces de la madre estaban también presentes en la microbiota del tracto digestivo de los lechones, indicando que las heces de la madre son la mayor fuente de bacterias para la colonización del tracto digestivo de lechones lactantes. Así, la colonización del tracto gastrointestinal empieza en el momento del parto, por contacto con la microbiota de la vagina de la madre (Melin, 2001). Posteriormente, el contacto con la piel y las heces de la madre van a constituir una de las fuentes más importantes de bacterias para la colonización del tracto digestivo. Sin embargo, esta elevada similitud entre la microbiota de la madre y la microbiota de los lechones, se pierde con el tiempo, llegando finalmente a ser similar entre animales de una misma camada y claramente diferente a la microbiota de la madre (Katouli *et al.*, 1997).

En un trabajo realizado por Swords y colaboradores (1993), se evaluó mediante cultivos bacterianos, los sucesivos cambios en las poblaciones bacterianas del colon distal durante los 120 primeros días de vida de los cerdos. En este estudio, se demostró que la población bacteriana del colon distal alcanza valores de 10^3 - 10^4 UFC/g de contenido digestivo a las pocas horas del nacimiento y que llegan a valores de 10^9 UFC/g de

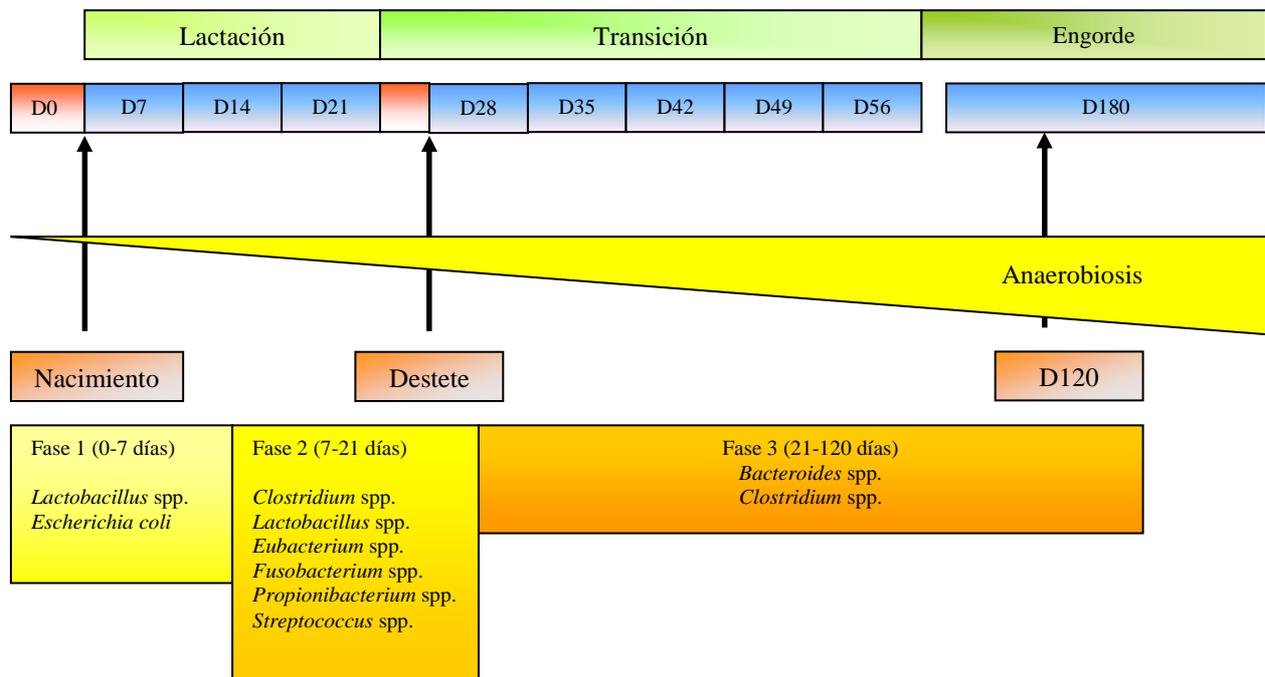
contenido digestivo a las 12 horas de vida. En este mismo trabajo, los autores propusieron dividir la colonización del tracto digestivo en 3 etapas diferentes. La primera etapa empezaría inmediatamente después del parto y acabaría al finalizar la primera semana de edad. La segunda fase, abarcaría desde finales de la primera semana de vida hasta finales de la fase de lactación. Finalmente, la tercera fase empezaría en el momento del destete (Figura 1.1.).

Durante la primera fase de la colonización, la microbiota del colon esta formada mayoritariamente por microorganismos aeróbicos o anaeróbicos facultativos, representando un 80 % de las bacterias totales (Swords *et al.*, 1993). Durante los días posteriores, la cantidad de bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas desciende gradualmente siendo reemplazadas por bacterias anaeróbicas estrictas. Por este motivo, algunos autores han propuesto que las bacterias que colonizan el tracto gastrointestinal durante las primeras horas de vida son las responsables de la reducción del potencial redox del intestino y de la creación de un medio favorable para la posterior colonización de las bacterias anaeróbicas estrictas (Conway, 1995; Stewart, 1997). Grupos de bacterias como *Lactobacillus* spp representan uno de los grupos más abundantes en esta fase, pudiendo constituir un 8-10% del total de la población microbiana (Swords *et al.*, 1993).

La segunda fase de la colonización del tracto digestivo coincide con el periodo de lactación. En esta fase, Swords y colaboradores (1993) demostraron una continua substitución de bacterias aeróbicas por bacterias anaeróbicas. Los grupos bacterianos cultivados fueron *Clostridium* spp, *Eubacterium* spp, *Fusobacterium* spp, *Propionibacterium* spp, así como diversas bacterias anaeróbicas del grupo streptococci. Sin embargo, bacterias como *Bacteroides* spp fueron detectadas de forma ocasional.

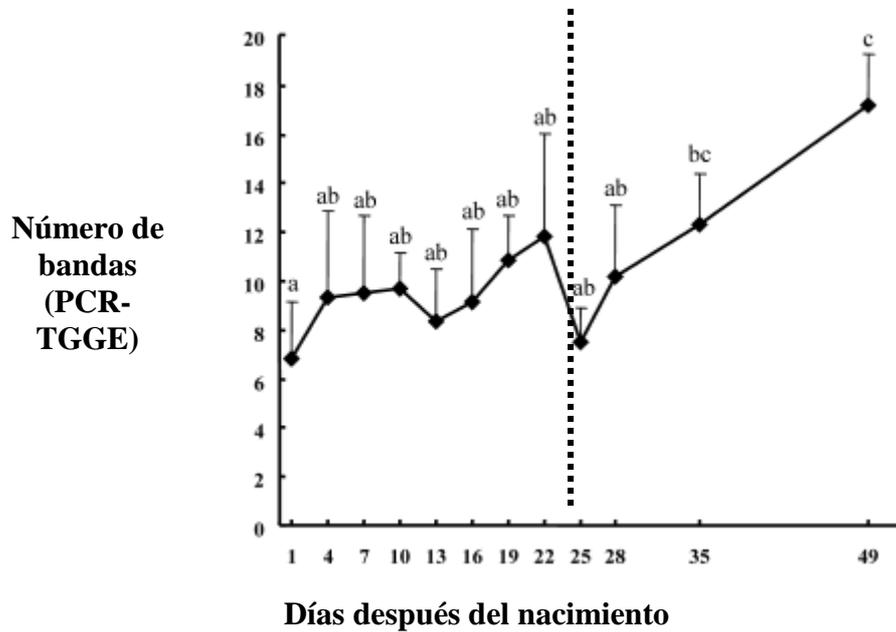
En el momento del destete empieza la tercera fase de colonización del tracto gastrointestinal, que se caracteriza por la sustitución de algunas bacterias anaeróbicas Gram-positivas por bacterias anaeróbicas Gram-negativas del género *Bacteroides* spp. En el mismo trabajo, Swords y colaboradores (1993) demostraron que, a los 120 días de edad, las bacterias aeróbicas representaban menos de un 0,1% del total de las poblaciones bacterianas.

Figura 1.1. Diagrama representativo de las diferentes fases de la colonización del colon distal de los cerdos (adaptado de (Swords *et al.*, 1993)).



Existen trabajos más recientes donde se analiza la composición de la microbiota del tracto gastrointestinal de cerdos de diferentes edades mediante la utilización de técnicas de biología molecular (Inoue *et al.*, 2005; Konstantinov *et al.*, 2006). Así, en un estudio realizado por Konstantinov y colaboradores (2006) con la técnica de la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) y análisis mediante gel de electroforesis con gradiente denaturalizante (DGGE), los autores no observaron diferencias significativas en el grado de diversidad intestinal (calculada como número de bandas) de los lechones lactantes de diferentes edades (2, 5, 13 y 19 días de vida). Además, en este mismo estudio, los autores tampoco observaron diferencias significativas entre los animales lactantes y los animales destetados de 23, 27 y 32 días de edad. Inoue y colaboradores (2005) mediante la utilización de una técnica similar (PCR-gel de electroforesis con gradiente de temperatura (TGGE)), demostraron un incremento gradual del número de bandas a lo largo del tiempo con una marcada reducción justo antes del destete (Figura 1.2.). Debido a que en este caso la disminución de la diversidad se observó justo antes del destete, no se pueden atribuir estos resultados a la separación de la madre.

Figura 1.2. Evolución de la diversidad microbiana, expresada como el número de bandas obtenidas mediante PCR - TGGE, del tracto digestivo de los cerdos desde el nacimiento hasta los 49 días de vida, (Inoue *et al.*, 2005). Valores con diferentes letras (a, b, c) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). La línea vertical negra indica el momento del destete de los animales.



Konstantinov y colaboradores (2006), mediante el uso del clonaje y secuenciación, determinaron los clones más abundantes tanto del íleon de cerdos neonatos (de 2 días de vida), como del íleon de cerdos destetados y de cerdos lactantes de 23 días de edad. Así, en este trabajo los autores demostraron que *Lactobacillus sobrius*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus acidophilus* eran las especies bacterianas más abundantes en el íleon de cerdos neonatos. Por este motivo, sugirieron el rol de estas bacterias en el establecimiento y mantenimiento de la homeostasis del tracto gastrointestinal. Además, estas bacterias también fueron encontradas de forma abundante en los animales lactantes de 23 días de vida. En el momento del destete, se observaron fluctuaciones importantes en las poblaciones microbianas del tracto digestivo. En este caso, la detección de *Lactobacillus sobrius* y *Lactobacillus reuteri* fue significativamente menor. Además, en los animales destetados, también se detectaron abundantes clones con alta similitud con bacterias del género *Clostridium* spp y *Escherichia coli*.

En este mismo estudio, los autores compararon el grado de similitud de los diferentes patrones de bandas. En este caso, se observó que el grado de similitud de los patrones de bandas de los cerdos lactantes era superior que el grado de similitud de los patrones de bandas de los cerdos destetados (grado de similitud de los animales lactantes = 45 %,

grado de similitud de los animales destetados = 21 %). Los autores sugirieron que estos cambios son probablemente debidos al paso de una dieta a base de leche a una dieta sólida rica en polisacáridos. Este cambio de dieta puede ayudar al establecimiento de nuevas comunidades bacterianas (Konstantinov *et al.*, 2006).

1.1.2. Composición de la microbiota en cerdos adultos

Los microorganismos que colonizan el tracto gastrointestinal se pueden clasificar de diferentes formas. Una de estas clasificaciones es la que tiene en cuenta el rol de las bacterias en el tracto digestivo. En este caso, las bacterias pueden ser clasificadas como bacterias residentes/autóctonas o bien bacterias no autóctonas o de paso. Así, como bacterias autóctonas se entiende al grupo de bacterias que colonizan un segmento determinado del tracto gastrointestinal durante las primeras fases de vida del animal y permanecen en el tracto digestivo de éste durante la mayor parte de la vida del animal. Las bacterias no autóctonas o de paso, van a ser bacterias que colonizan el tracto gastrointestinal de los animales de forma temporal o bien únicamente en algunos animales (Savage, 1977).

Aunque el concepto de microbiota intestinal se percibe como una entidad homogénea, se conoce que existe una estratificación horizontal de las diferentes especies bacterianas que habitan en los diferentes micro-hábitats del tracto gastrointestinal. De este modo, se conoce que las bacterias pueden permanecer de forma libre en la luz del intestino (creciendo de forma más rápida que los propios movimientos peristálticos), en la capa de mucus, en los espacios entre vellosidades o bien directamente adheridas en la mucosa intestinal (Fuller y Cole, 1988). Existen algunos estudios donde se han detectado diferencias entre las bacterias que residen en el lumen del intestino y las bacterias asociadas a la mucosa intestinal. Así, Pryde y colaboradores (1999), hallaron recuentos inferiores de bacterias totales en la mucosa del colon respecto a la luz del mismo (8.8×10^8 *versus* 2.3×10^{10} UFC/g de heces frescas). En este mismo estudio, se observó que la mayoría de las secuencias recuperadas de la pared del colon presentaban una baja similitud (menor al 95 %) con las secuencias de diferentes microorganismos depositadas en la base de datos del GenBank. Contrariamente, Simpson y colaboradores (1999), mediante la técnica de la PCR-DGGE, observaron una gran similitud entre los patrones de bandas encontrados en el lumen y en la mucosa del mismo tramo intestinal. Sin

embargo, debido al hecho de que en el tracto gastrointestinal existe una rápida renovación de las células epiteliales, una excreción de mucus y unos movimientos peristálticos, algunos autores, asumen que las bacterias adheridas a la mucosa representan un subgrupo de la microbiota de la luz intestinal (Leser *et al.*, 2002).

Diversos estudios han demostrado que la población microbiana del tracto gastrointestinal constituye un complejo ecosistema, pudiendo alcanzar valores de 10^{11} células/g de materia fresca (Pluske y Pethick, 1999). Este ecosistema, difiere cuantitativamente y cualitativamente a lo largo del tracto gastrointestinal (Savage, 1977). Así, en numerosos estudios, se ha descrito un incremento gradual de la cantidad de bacterias que habitan en el tracto gastrointestinal desde las partes más proximales a las regiones más distales (Leser *et al.*, 2002). Este hecho se explicaría por las diferentes condiciones que existen en los diferentes tramos del tracto gastrointestinal y que a continuación se exponen.

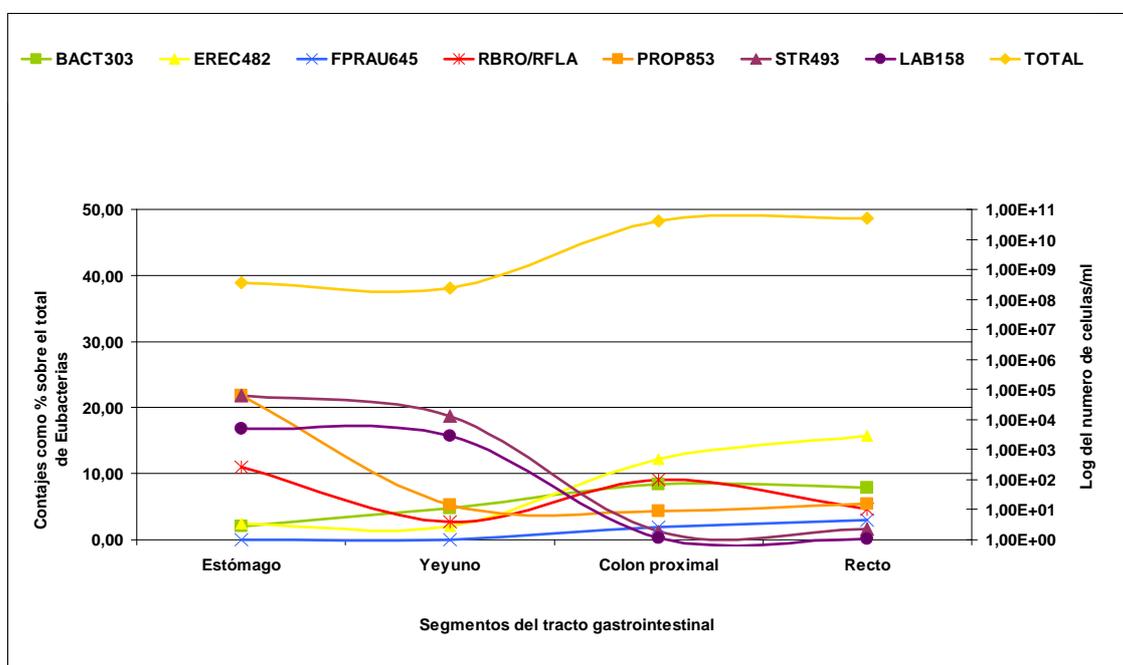
La cavidad oral, constituye una importante fuente de bacterias para todo el tracto digestivo. La fuente de estas bacterias probablemente se halla en el propio alimento, en la superficie de los dientes y en los tejidos blandos (Ewing y Cole, 1994). Esta cavidad está colonizada tanto por microorganismos aeróbicos, como anaeróbicos facultativos y estrictos, alcanzando valores de 10^7 UFC/g.

El estómago y los tramos proximales del intestino delgado contienen cantidades relativamente pequeñas de bacterias. Sin embargo, estos tramos no son estériles. En el estómago, la colonización microbiana se ve limitada por el pH ácido, las características de la superficie gástrica y la alta velocidad de vaciado gástrico (Ehle y Warner, 1978). En el ganado porcino, se ha demostrado que la densidad total de las bacterias cultivables del estómago puede alcanzar valores de 10^7 a 10^9 UFC/g de materia fresca, siendo estos valores superiores en la parte caudal del mismo (Jensen y Jorgensen, 1994). Asimismo, Castillo y colaboradores (2007b), mediante la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), detectaron valores de 4×10^8 bacterias/g de contenido gástrico.

Existen numerosos estudios donde se detallan los géneros bacterianos más frecuentemente aislados en el estómago (Conway, 1994; Deplancke *et al.*, 2000; Jensen, 2001). De ellos, se puede extraer que *Lactobacillus* spp, streptococci, *Clostridium* spp,

Eubacterium spp, y *Bifidobacterium* spp son los grupos bacterianos cultivables más frecuentes en este tramo. Asimismo, Castillo y colaboradores (2007b), mediante técnicas de biología molecular, demostraron que bacterias del grupo Streptococci, Lactococci y Clostridia (cluster IX) eran las más abundantes en esta localización (Figura 1.3.).

Figura 1.3. Cuantificación mediante la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de las bacterias totales y de diferentes grupos bacterianos expresado como número de células /mL de contenido digestivo. Las proporciones expresadas como % se calculan con respecto a la cantidad de bacterias totales. Los grupos analizados son: *Bacteroides/Prevotella* (sonda Bac303), clostridia cluster XIVa (Erec482), *Faecalibacterium prausnitzii* (Fprau645), *Ruminococcus flavefaciens* y *R. bromii* (Rbro730 y Rfla729), clostridia cluster IX (Prop853), *Streptococcus/Lactococcus* spp (Str493) y *Lactobacillus/Enterococcus* spp (Lab158). Gráfico adaptado del trabajo realizado por (Castillo *et al.*, 2007b).



En el intestino delgado, la cantidad total de bacterias varía en función del segmento analizado. En la parte más proximal del intestino delgado, se han detectado valores de 10^7 UFC/g de digesta, mientras que en tramos posteriores, las cantidades alcanzaron valores de 10^8 – 10^9 UFC/g de digesta (Bach Knudsen *et al.*, 1993; Jensen y Jorgensen, 1994). En el intestino delgado, el crecimiento bacteriano se ve limitado especialmente por los rápidos movimientos peristálticos. Es por este motivo, que este tramo intestinal estará colonizado mayoritariamente por bacterias con capacidad de adherencia al epitelio. Así, las condiciones que se dan en el intestino delgado (rápidos movimientos peristálticos, pH alrededor de 6 y secreciones biliares) facilitan el crecimiento de

bacterias aeróbicas, anaeróbicas facultativas o anaeróbicas de la familia Lactobacillaceae (*Lactobacillus* spp, *Streptococcus* spp), Bacillaceae (*Bacillus* spp, *Clostridium* spp) y Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*) (Jensen, 2001). El íleon representa la zona de transición entre la escasa microbiota de los tramos anteriores y la muy densa población bacteriana del intestino grueso. Los grupos predominantes en este tramo intestinal son *Lactobacillus* spp y *Pediococcus* spp. Bacterias pertenecientes a los grupos Clostridiales, Bacillares, y gamma-proteobacteria se encuentran en menores cantidades (Hill *et al.*, 2005).

En el intestino grueso, la densidad de bacterias puede alcanzar valores de 10^{11} - 10^{12} bacterias/g de contenido digestivo. Factores como el pH (con valores entre 5 - 8), el lento tránsito intestinal y el bajo potencial redox, van a permitir una mayor supervivencia de algunas especies bacterianas (Stewart, 1997). Además, estas mismas condiciones, van a determinar que sean las bacterias anaeróbicas las predominantes (Moore y Holdeman, 1974). Castillo y colaboradores (2007b), mediante la técnica del FISH, demostraron que las bacterias del grupo *Clostridium* cluster XIVa (con valores de un 10 y un 19 %), *Clostridium* cluster IX (con valores de un 4,7 y un 7,7 %) y *Bacteroides/Prevotella* (con valores entre un 4,5 y un 10 %) representan los grupos bacterianos predominantes del intestino grueso. Microorganismos del género *Streptococcus* spp y *Lactobacillus* spp representaron solamente un 0,5-2 % (Figura 1.3.).

1.1.3. Efectos de la microbiota

Las bacterias que conforman la microbiota intestinal proporcionan beneficios a los hospedadores. En este sentido, se ha descrito que la población microbiana que reside en el tracto digestivo tiene un impacto directo sobre la morfología, el sistema inmunitario y las características fisiológicas del tracto gastrointestinal. Parece ser que todos estos efectos dependen en gran medida del tipo de especie bacteriana. (McCracken y Gaskins, 1999).

1.1.3.1. Efecto de la microbiota sobre la morfología intestinal

Las diferencias morfológicas más notables se observan entre animales convencionales y animales libres de microorganismos. Así, en roedores libres de microorganismos, se ha descrito que el tamaño del ciego puede llegar a ser 8 veces mayor que en animales convencionales. Este hecho es debido a la acumulación de agua y mucus, y está relacionado con la ausencia de bacterias con capacidad mucolítica (*Peptostreptococcus micros*, *Ruminococcus* spp, *Bifidobacterias* spp). En otros tramos del tracto digestivo, también se han descrito algunas diferencias en la morfología intestinal en función de la colonización del mismo. En animales libres de microorganismos, se ha detectado un mayor volumen del fundus y una alteración de las mucinas que cubren la superficie del epitelio del estómago (Wostmann, 1996). Asimismo, el intestino delgado de los animales libres de microorganismos, tiene un menor peso que el de los animales convencionales. Este hecho se debe en gran parte a la ausencia de células inmunitarias de la lámina propia (Kenworthy, 1970).

A nivel microscópico, se ha observado que en ausencia de microbiota intestinal, las vellosidades son más delgadas y las criptas más cortas, provocando un incremento en la ratio vellosidad:cripta (Wostmann, 1996).

1.1.3.2. Efecto de la microbiota sobre parámetros bioquímicos y fisiológicos del tracto gastrointestinal

La microbiota que habita el tracto gastrointestinal ejerce un efecto sobre diferentes parámetros bioquímicos y fisiológicos del mismo, como pueden ser la motilidad intestinal, la síntesis de vitaminas y la capacidad fermentativa de diferentes componentes de la dieta. De esta forma, en animales libres de microorganismos, se ha demostrado una disminución de la motilidad intestinal (Husebye *et al.*, 1994). Este hecho parece estar relacionado con ciertos productos finales de la fermentación bacteriana. Por ejemplo, se ha demostrado que el ácido láctico estimula la motilidad intestinal (Tannock, 1999).

Los microorganismos del tracto gastrointestinal participan también en la síntesis de la vitamina K, de las vitaminas del complejo B y de determinados aminoácidos. Por ejemplo, en el caso de la vitamina K, se ha descrito que ésta puede ser producida por

una gran variedad de microorganismos que habitan el tracto gastrointestinal (*Bacteroides* spp, *Eubacterium* spp, *Propionibacterium* spp, *Fusobacterium* spp, *Bifidobacterium* spp, *Lactobacillus* spp, *Clostridium* spp, *Enterobacterium* spp, *Veillonella* spp, *Enterococcus* spp, *Enterobacteria* spp, y *Streptococcus* spp). En animales axénicos se ha demostrado una disminución tanto de la síntesis de vitaminas como de determinados aminoácidos (Savage, 1986; Wostmann, 1996).

La microbiota del tracto gastrointestinal también contribuye a la digestión de diferentes componentes de la dieta. En animales axénicos, se ha demostrado que la utilización de los carbohidratos es incompleta. Sin embargo, estos animales utilizan los componentes lípidicos de la dieta de forma más eficiente. (Tannock, 1999).

Por último, la microbiota del tracto gastrointestinal tiene también como función fisiológica la prevención de la colonización de éste por nuevas especies bacterianas, especialmente especies patógenas (Rolfe, 2000). Este hecho se debe a que las bacterias exógenas deben competir con las bacterias que habitan en el tracto gastrointestinal tanto por la disponibilidad de nutrientes como por los sitios de anclaje a la mucosa. Este fenómeno es conocido con el nombre de “exclusión competitiva” (Fuller, 1977).

1.1.3.3. Efecto de la microbiota sobre el sistema inmunitario

El contacto con la microbiota intestinal constituye un requisito esencial para el desarrollo del sistema inmunitario asociado. Por ejemplo, se ha demostrado que en los animales libres de gérmenes, los linfonodos mesentéricos son más pequeños, pesan menos y presentan una menor concentración celular (Gordon *et al.*, 1966). Además, también se ha descrito que tanto los linfonodos, como el bazo y otros tejidos linfoides, tienen un menor número de centros germinales. Otra peculiaridad de los animales axénicos es el hecho que el timo crece más lentamente y que nunca llega a alcanzar el tamaño que se encuentra en los animales convencionales (Bealmear, 1980).

En animales libres de microorganismos, también se ha detectado una menor cantidad de macrófagos, con menor actividad metabólica, con una peor capacidad para el procesamiento de antígenos y con una menor capacidad microbicida frente a ciertos patógenos (Bauer *et al.*, 1966; Heise *et al.*, 1966; MacDonald y Carter, 1978;

Woolverton *et al.*, 1992). También se ha descrito que los cerdos axénicos poseen un menor número de linfocitos intraepiteliales que los cerdos convencionales (Rothkötter *et al.*, 1999).

En cuanto a la respuesta inmune de tipo humoral, se ha encontrado que los ratones libres de microorganismos tienen menor concentración de inmunoglobulina A, disminuyendo así el control de la adherencia de determinadas bacterias a las células epiteliales entéricas (Wostmann, 1961).

1.2. COMPONENTES PRINCIPALES DE LA DIETA Y SU EFECTO SOBRE LA MICROBIOTA DEL TRACTO DIGESTIVO

Los cerdos son animales monogástricos, con una digestión principalmente enzimática y su tracto gastrointestinal tiene como función principal transformar los alimentos ingeridos en nutrientes que puedan ser posteriormente absorbidos y disponibles para el organismo. Las dietas de los cerdos son ricas en almidón, proteínas, grasas y pobres en fibra. En granjas convencionales, los cerdos son alimentados con piensos compuestos (varias materias primas), completos (equilibrados como dieta única) y formulados en base a la materia fresca. El programa de alimentación de los cerdos consta de diferentes piensos según el peso, la edad y el estado fisiológico de los animales. Generalmente la alimentación es *ad libitum*, excepto para cerdas gestantes. Las dietas más complejas son las de lechones, las cuales incluyen materias primas especiales como productos lácteos, harina de pescado, concentrados de proteína vegetal y/o cereales procesados térmicamente. Los piensos para cerdos de engorde y cerdas gestantes son de menor complejidad y suelen cambiarse periódicamente para adaptarse a los precios del mercado de las materias primas y a su disponibilidad.

Tras la prohibición paulatina de la utilización de los antibióticos promotores del crecimiento, se han realizado muchos esfuerzos para encontrar alternativas a los antibióticos promotores del crecimiento. Por esto, las nuevas estrategias nutricionales que se han ido desarrollando han adquirido más relevancia. Entre ellas cabe destacar: i) la modificación del procesado o de la estructura de los alimentos mediante diferentes grados de molturación o tratamiento térmico, ii) cambios en los ingredientes mediante la utilización de diferentes fuentes de proteínas, fuente de energía etc. iii) la utilización de

diferentes aditivos en el pienso (Canibe y Jensen, 2003; Hedemann *et al.*, 2005; Mikkelsen *et al.*, 2004; Pluske *et al.*, 1998). Sin embargo, conocer la relación entre los diferentes componentes de la dieta y el efecto sobre la microbiota intestinal es una tarea compleja. A continuación se intentará remarcar los aspectos más destacados de cada uno de ellos, haciendo especial énfasis en los que se han analizado en los estudios experimentales de esta tesis (capítulos 3 y 4).

1.2.1. Macronutrientes

1.2.1.1. Componentes nitrogenados: Proteínas y aminoácidos

Los componentes nitrogenados de la dieta engloban mayoritariamente proteínas, y aminoácidos. Sin embargo, también existe un grupo minoritario de componentes nitrogenados no proteicos compuesto por aminas, amidas, amoniac, nitratos, alcaloides, ácido úrico, vitaminas del grupo B, purinas y pirimidinas, etc. En el ganado porcino, las principales fuentes de proteínas de la dieta provienen de suplementos proteicos basados en harinas de pescado o concentrados vegetales de soja o patata. En menor cantidad, también van a ser fuentes de proteínas otras leguminosas y cereales (de Blas *et al.*, 2003).

La digestión de proteínas empieza en el estómago, donde éstas son desnaturalizadas y parcialmente hidrolizadas (obtención de polipéptidos de alto peso molecular), mediante la acción del ácido clorhídrico y de los enzimas gástricos (pepsina). En el intestino delgado, mediante la acción de las enzimas pancreáticas (tripsina y quimotripsina), los polipéptidos van a ser hidrolizados hasta aminoácidos libres y dipéptidos. Estos productos van a ser absorbidos, tanto en el yeyuno como en el íleon (Banks, 1993), o procesados por las bacterias intestinales, como fuente de nitrógeno.

A pesar de que la degradación proteica empieza en los tramos proximales del tracto digestivo, gran parte de estos componentes (restos de aminoácidos, péptidos, proteínas desnaturalizadas y amino azúcares) van a llegar al tracto digestivo posterior. Va a ser en estos tramos, especialmente en los más distales, donde la microbiota intestinal va a fermentar estas moléculas. Por ejemplo, se ha descrito que bacterias pertenecientes al género *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* van a

ser capaces de descarboxilar diferentes aminoácidos (Macfarlane y Macfarlane, 1995). De la fermentación de los aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina), se van a formar los ácidos grasos ramificados (Macfarlane *et al.*, 1992). Al mismo tiempo, se van a producir diferentes productos tóxicos como el amoníaco, las aminas, los fenoles e los indoles (Macfarlane *et al.*, 1992). Estos derivados van a ser potencialmente dañinos para la mucosa intestinal (Lin y Visek, 1991). La capacidad de fermentar los productos nitrogenados va a estar relacionada con la cantidad de carbohidratos disponibles en los tramos digestivos posteriores. Así, se ha demostrado que a medida que los carbohidratos disminuyen, se incrementa la fermentación proteica (Piva *et al.*, 1996).

En general, se asume que niveles altos de proteínas pueden tener una influencia negativa sobre la fisiología intestinal. Se ha observado que dietas bajas en proteínas (<17 %) ayudan a mantener la salud intestinal de los lechones recién destetados. Este hecho se explica por una menor llegada de proteína no digerida a tramos intestinales posteriores, permitiendo una reducción tanto de las fermentaciones proteicas, como del crecimiento de bacterias patógenas y/o de la producción de metabolitos tóxicos (Nyachoti *et al.*, 2006). En animales alimentados con dietas ricas en proteínas, también se ha demostrado una disminución de la población de bifidobacterias en el ciego, probablemente, por el efecto negativo que tienen los productos de la fermentación proteica sobre las poblaciones de bifidobacterias (Lynch *et al.*, 2007).

1.2.1.2. Lípidos

Las grasas y los aceites se incluyen en la dieta en niveles variables (4-10 %) y son ingredientes importantes debido a su alto valor energético. Los lípidos están compuestos por una amplia gama de sustancias: ácidos grasos, acilglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos, colesterol y ceras. En el intestino delgado, los lípidos se emulsionan con las sales biliares y son digeridos por las lipasas pancreáticas y las lipasas que hay en las microvellosidades. Posteriormente, estos componentes son absorbidos a través del epitelio intestinal. El grado de digestibilidad de los diferentes lípidos dependerá del tipo de grasa y del grado de saturación (Veum, 1991).

Existen pocos estudios centrados en determinar el rol de la microbiota intestinal sobre la digestión de los lípidos de la dieta. En algunos de estos estudios, se describe el papel de

las bacterias intestinales sobre el metabolismo de los ácidos biliares. Por ejemplo, se ha demostrado que *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacteroides* spp, *Eubacterium* spp, y *Clostridium* spp tienen capacidad de deshidroxilar los ácidos biliares (Baron y Hylemon, 1997). También se ha demostrado que la microbiota del tracto gastrointestinal puede modificar los niveles de colesterol. Bacterias del género *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Clostridium* tienen la capacidad de metabolizar el colesterol a coprostanol (Baron y Hylemon, 1997). Asimismo, cuando se administra de forma continuada bacterias del género *Lactobacillus*, se ha observado una disminución significativa de los niveles de colesterol total y de LDL-colesterol en suero (De Smet *et al.*, 1998).

Existen pocos estudios donde se determine el efecto de los lípidos de la dieta sobre la microbiota intestinal. En un trabajo realizado por Sangild y colaboradores (2003), los autores encontraron diferencias significativas en diferentes poblaciones microbianas del tracto digestivo de las cerdas alimentadas con una dieta rica en grasa. Concretamente, se observó un incremento significativo del recuento de enterobacterias totales y levaduras a lo largo de todo el tracto gastrointestinal y una disminución de los lactobacilli en el intestino grueso (Sangild *et al.*, 2003).

1.2.1.3 Carbohidratos

Los carbohidratos son el ingrediente utilizado en mayor proporción en la alimentación de los cerdos, representando más del 60 % de la materia seca de la dieta (Bach Knudsen y Jorgensen, 2001). El término “carbohidratos” engloba sustratos muy heterogéneos que pueden diferir tanto en su composición (pentosas, hexosas, etc.), en el tipo de enlace glicosídico (α, β), como en su tamaño (desde moléculas con estructura simple, como son los monosacáridos, hasta estructuras más complejas como son los polisacáridos). La ración de los cerdos está constituida por cantidades relativamente pequeñas de mono-, di- y oligosacáridos (1-2 %, 1-5 % y 1-10 %, respectivamente) y en mayor medida de polisacáridos amiláceos (40-70%) y polisacáridos no amiláceos (PNAs 10-50 %) (Pérez y Gasa, 2002). Los azúcares de bajo peso molecular, especialmente la lactosa y la sacarosa, van a ser los componentes mayoritarios en dietas de los cerdos durante las primeras edades. En cuanto al almidón, este va a ser la mayor fuente de polisacáridos de las plantas y representa una de las mayores fuentes de carbohidratos de las dietas de los

cerdos (Björck, 1996). El almidón va a ser, generalmente, bien digerido y absorbido en el intestino delgado. Sin embargo una cierta cantidad de almidón puede resistirse a la digestión (almidón resistente) y alcanzar tramos posteriores. Así, el almidón puede ser resistente a la digestión por ser físicamente inaccesible (por ejemplo en el caso de una molturación grosera – Almidón resistente Tipo I), por su compactación (en el caso del almidón de patata – Almidón resistente Tipo II), por su retrogradación después de un tratamiento térmico (Almidón resistente Tipo III) o por su modificación química (Almidón resistente Tipo IV). Juntamente con el almidón resistente, los PNAs van a ser los carbohidratos más abundantes en el intestino grueso. Estos PNAs pueden ser más o menos solubles. En este sentido, cuanto mayor es su solubilidad, mayor va a ser su fermentación (McBurney *et al.*, 1985).

En cuanto a su degradación, los azúcares más simples (monosacáridos, disacáridos) van a ser absorbidos directamente a través de la mucosa intestinal o bien van a ser digeridos por la acción de enzimas endógenas secretadas en los tramos proximales del tracto gastrointestinal. Los polisacáridos más complejos van a ser fermentados por bacterias que habitan el intestino grueso.

Así, teniendo en cuenta los procesos digestivos que tienen lugar en el tracto digestivo de los cerdos, los carbohidratos pueden ser clasificados como: carbohidratos que van a ser digeridos por acción de las enzimas endógenas (azúcares y parte del almidón) y carbohidratos no digeribles por acción enzimática. Los carbohidratos no digeribles van a formar parte de la **fibra dietética**, entendiéndose como fibra dietética las partes de las plantas que no van a poder ser digeridas por las secreciones endógenas del intestino delgado. El término fibra dietética engloba PNAs solubles, PNAs insolubles, oligosacáridos no digeribles, almidón resistente y la lignina (Trowell *et al.*, 1976). Estos componentes van a llegar a tramos posteriores del tracto gastrointestinal donde van a ser susceptibles de la fermentación bacteriana (Montagne *et al.*, 2003). La fermentación va a depender de la solubilidad, del grado de lignificación y del tamaño de partícula (Cummings, 1982).

La digestión de los carbohidratos empieza en la cavidad oral. Mediante la masticación de los alimentos, se reduce el tamaño de partícula y son mezclados con la saliva (Argenzio, 1993) que contiene enzimas como la α -amilasa que van a digerir parte de los

carbohidratos. Una vez el alimento es deglutido, la digestión va a continuar en el estómago. En este órgano, el contenido de la digesta va a ser retenido para reducir más el tamaño de las partículas. A su vez, en este órgano, se va a perder la actividad α -amilasa de la saliva debido al bajo pH de este órgano. Ya en la parte proximal del intestino delgado, la digesta se mezcla con las sales biliares y con las secreciones pancreáticas. Mediante la acción de las amilasas pancreáticas (β -galactosidasa y α -glucosidasa), se va a hidrolizar parte del almidón. Los productos obtenidos de esta hidrólisis van a ser absorbidos mayoritariamente a través de la mucosa intestinal en forma de glucosa, galactosa o fructosa.

La capacidad fermentativa del estómago y del intestino delgado de los animales monogástricos es limitada. Este hecho se debe fundamentalmente a su baja densidad microbiana y al rápido tránsito de la digesta en estos tramos proximales. Todas las macromoléculas que no hayan sido digeridas en los tramos proximales del tracto digestivo van a llegar al intestino grueso, donde van a ser hidrolizadas mediante la acción de diferentes hidrolasas bacterianas como las xilanasas, las celulasas, etc. Posteriormente, los productos de la hidrólisis van a ser fermentados por la microbiota intestinal. Carbohidratos como la celulosa, o los β -glucanos, van a llegar al intestino grueso sin ninguna hidrólisis previa ya que la capacidad amilolítica de la α -amilasa es limitada, rompe únicamente los enlaces tipo α y no ejerce ninguna actividad frente a los enlaces β .

En la Tabla 1.1., se muestran las principales enzimas y las especies bacterianas involucradas en la hidrólisis de diferentes polisacáridos. A partir de esta tabla se puede concluir que los principales géneros bacterianos con capacidad de degradar estos componentes a nivel del intestino grueso son: *Bacteroides* spp, *Bifidobacterium* spp, *Ruminococcus* spp y algunas especies de *Eubacterium* spp y *Clostridium* spp.

Hoy en día, se conoce que la inclusión de ingredientes fibrosos en la dieta tiene efectos beneficiosos. Concretamente, estos componentes incrementan el llenado intestinal, incrementando así la sensación de saciedad (Meunier-Salaun *et al.*, 2001), y aumentan la velocidad de tránsito, reduciendo el riesgo de constipación (Tabeling *et al.*, 2003).

Tabla 1.1. Actividades enzimáticas de las bacterias del colon de los seres humanos (adaptado de (Bernalier *et al.*, 1999)).

Carbohidrato de la dieta	Enzimas	Especies bacterianas
Celulosa	Celulasa	<i>Bacteroides</i>
	Glicosidasa	<i>Ruminococcus</i>
Xilanos	Xilanasa	<i>Bacteroides</i>
	Arabinofuranosidasa	<i>Bifidobacterium</i>
	Xilosidasas	
Arabinogalactan	Arabinogalactanasa	<i>Bacteroides</i>
	Arabinofuranosidasa	<i>Bifidobacterium</i>
	Galactosidasa	
Pectina	Pectinasa	<i>Bacteroides</i>
	Glucuronidasa	<i>Bifidobacterium</i>
	Arabinofuranosidasa	<i>Eubacterium</i>
		<i>Clostridium</i>
Almidón		<i>Lachospira</i>
	Amilasa	<i>Bacteroides</i>
	Glicosidasa	<i>Bifidobacterium</i>
		<i>Eubacterium</i>
Goma de guar	Galactomannasas	<i>Clostridium</i>
	Mannosidasa	<i>Fusobacterium</i>
	Galactosidasa	
Goma arábica	Arabinogalactanasa	<i>Bacteroides</i>
	Galactosidasa	<i>Ruminococcus</i>
	Glucuronidasa	
Galacto-oligosacáridos		<i>Bifidobacterium</i>
	B-galactosidasa	<i>Lactobacillus</i>
		<i>Bacteroides</i>
Fructo-oligosacáridos		<i>Bifidobacterium</i>
	Fructooligosacaridasa	<i>Eubacterium</i>
		<i>Clostridium</i>

Existen diferentes trabajos en los que se investiga la influencia de la concentración y el tipo de fibra sobre la composición y la actividad metabólica de las poblaciones microbianas que habitan el tracto digestivo en la especie porcina. Varel y colaboradores (1984), demostraron que tras la alimentación de cerdos con dietas con alto contenido en fibra (35 % de alfalfa deshidratada), incrementaba el número de especies bacterianas con capacidad celulolítica y hemicelulolítica en el intestino grueso (*Fibrobacter succinogenes*, *Fibrobacter intestinales*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefacies*, *Butyrivibrio* spp, *Bacteroides* spp). Asimismo, en un estudio realizado por Gibson y colaboradores (1994), se observó un incremento de bacterias del ácido láctico tras la ingestión de fibras altamente fermentables como la inulina.

Además del cambio en la proporción de determinadas especies bacterianas, se ha visto que, mediante la administración de diferentes ingredientes fibrosos, también se puede modificar la carga bacteriana total, la diversidad microbiana y su actividad. En un estudio realizado por Jensen y Jorgensen (1994) donde se comparaban dos dietas con diferentes niveles de fibra, se demostró que los cerdos alimentados con alta cantidad de fibra presentaban una cantidad mayor de bacterias cultivables a nivel del estómago. También se detectó una mayor actividad microbiana en el intestino grueso de los cerdos alimentados con una dieta rica en fibra (Jensen y Jorgensen, 1994). Asimismo, en otro estudio realizado por Martínez-Puig y colaboradores (2003), se observó una mayor actividad metabólica en los cerdos alimentados con almidón de patata (almidón resistente tipo II) que en los cerdos alimentados con almidón de maíz.

En cuanto a la diversidad microbiana, en un estudio realizado por Canibe y colaboradores (2005), los autores demostraron que mediante la utilización de una dieta rica en maíz grosero, (almidón resistente tipo I) se incrementaba la diversidad microbiana en el estómago y a su vez se reducía la cantidad de enterobacterias a nivel de ciego. Konstantinov y colaboradores (2004), demostraron una mayor diversidad microbiana y una estabilización más rápida de las poblaciones bacterianas en lechones alimentados con diferentes fuentes de carbohidratos altamente fermentables (pulpa de remolacha, fructoligosacáridos, lactulosa o inulina).

A pesar del nivel actual de conocimiento de esta materia, existen estudios con resultados contradictorios cuando se intenta relacionar la aparición de enfermedades entéricas con la utilización de fibra en la dieta. Por ejemplo, existen algunos trabajos donde se ha demostrado que las dietas porcinas con bajo nivel de fibra reducen el riesgo de infección por *Brachispira hyodisenteriae* (Durmic *et al.*, 1998; Pluske *et al.*, 1996). Sin embargo, en otros trabajos no se ha observado ninguna relación (Lindecrona *et al.*, 2003).

Tras la fermentación de los carbohidratos, se generan una serie de productos intermediarios como el lactato o el succinato. Estos productos van a ser metabolizados dando lugar a la formación de los ácidos grasos de cadena corta (AGVs) y a diferentes gases (hidrógeno, dióxido de carbono y metano) como productos finales de la fermentación. Estos productos, una vez absorbidos, pueden representar hasta un 25 % de las necesidades energéticas del cerdo (Bergman, 1990). El acetato, el propionato y el

butirato, con una ratio típica de 60:25:15, respectivamente, van a ser los principales AGVs obtenidos tras la fermentación de los carbohidratos (Christensen *et al.*, 1999). Sin embargo, la composición de los AGVs depende de muchos factores, como: el tipo y la estructura química de los mismos polisacáridos, la actividad de la población microbiana, el tiempo de tránsito intestinal, el tramo intestinal analizado, etc. (Englyst *et al.*, 1987). Los AGVs van a ser absorbidos a través del epitelio del colon e incorporados en diferentes vías metabólicas. Así, el ácido acético, una vez absorbido, llega a la circulación sistémica y es metabolizado en los músculos, los riñones, el corazón y el cerebro. En cuanto al ácido propiónico, es metabolizado en el hígado. En este caso, se conocen una gran variedad de efectos biológicos del propiónico, afectando a la glicólisis, la gluconeogénesis, la ureogénesis, la oxidación de ácidos grasos y la síntesis de colesterol (Demigne y Morand, 1999). Finalmente, el ácido butírico es metabolizado mayoritariamente en el epitelio del colon, siendo el principal sustrato energético de los colonocitos (Roediger, 1980).

1.2.2. Micronutrientes

1.2.2.1. Probióticos

La primera descripción del efecto de los probióticos fue realizada ya en año 1907, cuando Metchnikoff y colaboradores (1907) sugirieron que la ingesta de bacterias podía tener un efecto positivo sobre la microbiota normal del tracto digestivo. Este concepto ha ido evolucionado con el tiempo y actualmente el concepto de probiótico se define como una serie de microorganismos viables, no patógenos, que al ser ingeridos en cantidades adecuadas tienen una influencia positiva en la salud del huésped (FAO/WHO, 2001; Schrezenmeir y de Vrese, 2001) Otras características que los probióticos deben cumplir son: ser estables durante su procesado y almacenamiento, ser capaces de resistir el pH ácido del estómago, ser estables frente a la acción de las sales biliares y resistir a la acción de las enzimas pancreáticas.

A pesar de que actualmente no se conoce la forma exacta del mecanismo de acción de los probióticos, se cree que éste es debido a la capacidad de ciertos microorganismos de establecer o de ser ellos mismos parte de una microbiota intestinal beneficiosa para el animal (Gibson y Roberfroid, 1995). Además, se han postulado diferentes hipótesis

como el hecho de que los probióticos puedan generar sustancias con capacidad de inhibición del crecimiento de determinados grupos bacterianos (ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y diferentes sustancias bactericidas). Otro posible mecanismo de acción de los probióticos es el hecho de que estos puedan inhibir la adhesión de determinadas bacterias a nivel de la superficie epitelial (Goldin *et al.*, 1992) o competir por los nutrientes con otros microorganismos de la microbiota intestinal. En estudios más recientes, se ha demostrado que los probióticos pueden estimular la inmunidad, protegiendo así al huésped de diferentes enfermedades intestinales (Fukushima *et al.*, 1998; Saavedra *et al.*, 1994) y neutralizar toxinas (Castagliuolo *et al.*, 1996; Castagliuolo *et al.*, 1999; Pothoulakis *et al.*, 1993). Además, se ha sugerido que los probióticos pueden afectar la permeabilidad del intestino, incrementando la captación de nutrientes (Lee *et al.*, 1999; Stewart y Chesson, 1993).

Los probióticos más utilizados en cerdos incluyen tanto bacterias del ácido láctico como lactobacilli (*Lactobacillus rhamnosus*), enterococci (*Enterococcus faecium*) y *Pediococcus* spp, bacterias no lácticas del género *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus toyoi*) y levaduras del género *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae*). Su utilización puede ser tanto en forma simple como en combinaciones de estos mismos microorganismos.

Actualmente existen diferentes estudios donde se demuestra un efecto positivo de la utilización de diferentes probióticos. Así, se ha observado que probióticos como *Bifidobacterium pseudolongum* o *Lactobacillus acidophilus*, incrementan el peso corporal y disminuyen la mortalidad de los lechones (Abe *et al.*, 1995). Esta mejora de los parámetros productivos también ha sido descrita en el caso de *Streptococcus faecium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces spp* (Adami y Cavazzoni, 1999; Kumprecht y Zobac, 1998; Kyriakis *et al.*, 1999; Mathew *et al.*, 1998). Mediante la utilización de probióticos como *Brevibacterium lactofermentum* o *Bacillus licheniformis* se ha demostrado una reducción de la incidencia y gravedad de las diarreas (Kyriakis *et al.*, 1999; Toride *et al.*, 1998). También se ha visto que determinadas cepas de *Enterococcus faecium* tienen la capacidad de inhibir la adhesión de *Escherichia coli* K88 en el intestino delgado de los lechones (Jin *et al.*, 2000). A pesar de que en múltiples trabajos se ha demostrado un efecto positivo de la utilización de los probióticos, es importante resaltar que existen muchos otros trabajos científicos

donde no se han observado estos resultados (*Brown et al.*, 1997; *Kowarz et al.*, 1994). Esta variabilidad en los resultados puede estar asociada a la utilización de diferentes cepas bacterianas, a la dosis utilizada, a las condiciones de almacenamiento de los probiótico, a la composición de la dieta, a la estrategia de alimentación y a las condiciones higiénico-sanitarias de los animales (Chesson, 1994).

1.2.2.2. Prebióticos

Otro sistema mediante el cual se puede manipular la microbiota del tracto digestivo, es utilizando prebióticos. Estos productos se definen como ingredientes alimentarios, no digeribles por el animal, que afectan selectivamente al crecimiento y/o la actividad de una o varias bacterias del tracto digestivo y contribuyen a la salud del intestino (Gibson y Roberfroid, 1995). De esta misma forma, para que un ingrediente sea considerado como un prebiótico, éste debe tener capacidad de llegar al intestino grueso sin ser digerido previamente por hidrolasas pancreáticas, ser fermentado selectivamente por una o un limitado número de bacterias beneficiosas que habitan en el colon (estimulando así su crecimiento o su actividad) y ser capaz de inducir efectos beneficiosos sobre el huésped (Gibson, 1999).

Se consideran bacterias beneficiosas para la salud intestinal microorganismos del género *Bifidobacterium* y bacterias del ácido láctico (*Lactobacillus* spp, algunas especies de *Streptococcus*), mientras que algunas especies de los géneros *Bacteroides*, *Clostridium* y de la familia *Enterobacteriaceae*, debido a sus actividades metabólicas o a su potencial patogénico, se consideran perjudiciales. Así, mediante la utilización de ingredientes con capacidad prebiótica, se pretende potenciar los grupos bacterianos considerados beneficiosos para el huésped y controlar los grupos bacterianos considerados perjudiciales.

Entre otros, tienen capacidad prebiótica los fructooligosacáridos, la inulina, los galactooligosacáridos, los mananoligosacáridos, los maltooligosacáridos, los agarooligosacáridos, los xilooligosacáridos, la rafinosa, la lactulosa, etc. Así, se ha descrito que los fructooligosacáridos y la inulina estimulan el crecimiento de bacterias del género *Bifidobacterium* (Hsu *et al.*, 2004), así como del género *Bacteroides*, *Mitsuokella*, *Clostridium* y *Eubacterium* (Yamada *et al.*, 1993). En referencia a los

arabinosilanos estos pueden incrementar las concentraciones de lactobacilli y reducir la concentración de *Clostridium perfringens* en heces (Grieshop *et al.*, 2002). Estos resultados pueden explicarse por el crecimiento selectivo de algunos grupos bacterianos y por el efecto inhibitorio de sus productos de metabolismo sobre el crecimiento de otras especies bacterianas (Russell y Diez-Gonzalez, 1998).

Además de modificar la microbiota del tracto gastrointestinal, los prebióticos pueden ocasionar otros efectos a nivel del tracto gastrointestinal. Por ejemplo se ha descrito que pueden modular el tránsito intestinal, la proliferación de las células epiteliales, la actividad inmunitaria, etc. También pueden bloquear la unión bacteriana al epitelio o bien incrementar la resistencia a la invasión de determinados patógenos (Bovee-Oudenhoven *et al.*, 2003).

1.2.2.3. Acidificantes

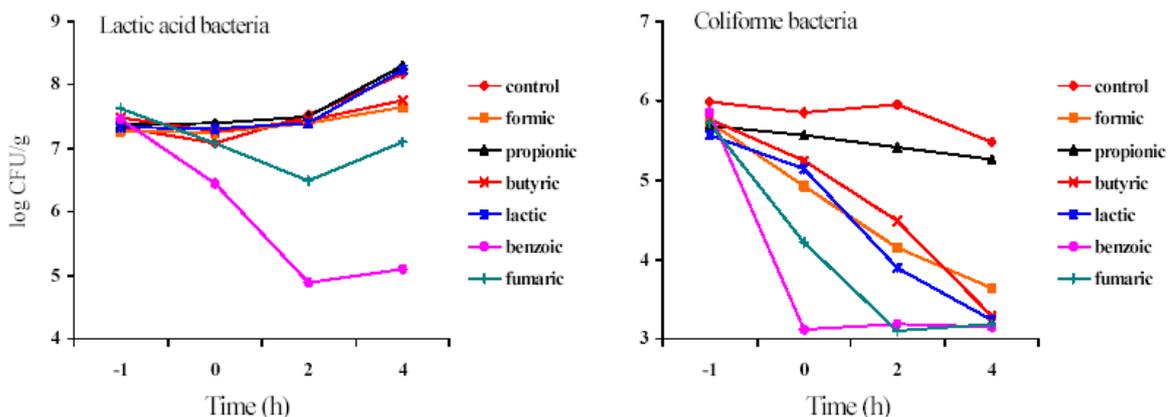
La acción de los ácidos orgánicos como conservantes de los alimentos (evitando su destrucción bacteriana y fúngica) se conoce desde hace muchos años. Sin embargo, además de esta acción higienizadora de los alimentos, los acidificantes ejercen una acción directa sobre la microbiota que habita en el tracto gastrointestinal de los animales. Por este motivo, el uso de los acidificantes se ha incrementado considerablemente en los últimos años, siendo el ácido fórmico, el acético, el propiónico, el butírico, el láctico, el formiato de calcio y el propionato de calcio los más utilizados.

Está demostrado que los acidificantes ejercen una acción tanto antimicrobiana como promotora del crecimiento. Los ácidos orgánicos juegan un papel importante en el control de los diferentes microorganismos patógenos del tracto gastrointestinal (Russell y Diez-Gonzalez, 1998). Parece ser que esta capacidad antimicrobiana es debida en parte a la capacidad de los ácidos orgánicos para disminuir el pH del estómago mediante la acción del protón de hidrogeno. Esta reducción del pH en el tracto gastrointestinal es especialmente importante en lechones recién destetados, ya que en esta fase la capacidad de secreción del ácido clorhídrico del estómago es limitada (Maxwell, 2001). Sin embargo, existen estudios donde se ha demostrado el efecto antimicrobiano de los ácidos sin ninguna reducción del pH de la digesta tras la inclusión de diferentes

acidificantes (Franco *et al.*, 2005; Risley *et al.*, 1991). Esto indicaría que la acidificación del medio no es el único mecanismo utilizado para el control de las poblaciones microbianas del tracto gastrointestinal. Otro mecanismo por el que se puede explicar la reducción de la actividad bacteriana es por la capacidad de determinados ácidos de entrar libremente dentro de las células bacterianas, disociarse en el citoplasma y alterar el pH intracelular causando daños irreversibles (Partanen, 2001).

La capacidad antimicrobiana de los acidificantes depende de diversos factores, como el tiempo de exposición, la concentración o el tipo de ácido utilizado. Así, por ejemplo, se ha demostrado que los ácidos de cadena corta (con menos de ocho átomos de carbono) son más eficaces frente bacterias Gram-negativas, mientras que los ácidos de cadena larga ejercen un efecto antimicrobiano mayor frente a bacterias Gram-positivas (Cherrington *et al.*, 1991). Además, parece ser que la actividad antimicrobiana de los acidificantes es mayor frente a bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp), mientras que otras bacterias como las del ácido láctico son más resistentes (Lueck, 1980). También se han observado diferentes actividades antimicrobianas frente a los coliformes en función del ácido utilizado (ácido propiónico < ácido fórmico < ácido butírico < ácido láctico < ácido fumárico < ácido benzoico. Figura 1.4.) (Canibe *et al.*, 2004). Asimismo, se ha demostrado que mientras el ácido acético reduce tanto el crecimiento de las bacterias, como el de las levaduras y los mohos, la acción de ácidos como el propiónico va a ser más específica inhibiendo mayoritariamente el crecimiento de los mohos (Partanen, 2001).

Figura 1.4. Supervivencia de las bacterias del ácido láctico y de los coliformes (log UFC/g de muestras) en el contenido gástrico (pH 4.5) cuando se utilizan diferentes ácidos orgánicos (adaptado de (Canibe *et al.*, 2004)).



La concentración de ácido utilizada es otro factor a tener en cuenta. Canibe y colaboradores (2004), detectaron una disminución de los recuentos de las bacterias del ácido láctico, de enterobacterias y de levaduras tras la utilización de un 2 % de ácido benzoico, mientras que no se detectaron diferencias significativas tras la utilización de un 1% de ácido benzoico.

Además de los efectos descritos previamente sobre la microbiota intestinal, muchos de los ácidos orgánicos (ácido cítrico, fumárico, fórmico, propiónico, sórbico, o el ácido málico) tienen un efecto positivo sobre los parámetros productivos de los animales (Han *et al.*, 1998; Partanen y Mroz, 1999).

1.2.2.4. Extractos de plantas

Desde hace miles de años, las plantas y sus respectivos extractos han sido ampliamente utilizados en medicina humana y veterinaria. Más recientemente, la utilización de extractos de plantas ha ganado interés, en el campo de la nutrición animal, como posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento.

Una de las propiedades más importantes de los extractos de plantas es su efecto antimicrobiano. Este efecto va a depender básicamente del tipo de extracto utilizado, de la dosis empleada y la sensibilidad de los diferentes grupos bacterianos. Tras numerosos estudios *in vitro*, se puede afirmar que extractos de canela (cinamaldehído), tomillo (timol), orégano (carvacrol) y de clavo de olor (eugenol) tienen una alta actividad antimicrobiana (Dorman y Deans, 2000; Hammer *et al.*, 1999; Smith-Palmer *et al.*, 1998).

En cuanto a la dosis utilizada, también se han observado algunas diferencias. Lee y Ahn (1998) demostraron en un estudio *in vitro*, que cantidades inferiores a 0,5 mg de cinamaldehído por disco no alteraban el crecimiento de los diferentes grupos bacterianos, mientras que cantidades de 5 mg inhibían claramente el crecimiento de *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis* y *Bifidobacterium bifidum*.

Asimismo, se han observado diferencias entre los diferentes grupos bacterianos. Lee y Ahn (1998) demostraron que el cinamaldehído ejercía un efecto antimicrobiano más

potente frente a *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis* y *Bifidobacterium bifidum* que frente a *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus acidophilus*.

Aunque los resultados obtenidos de los estudios *in vitro* no se pueden inferir directamente a las condiciones *in vivo*, aportan una información importante sobre su posible eficacia y su espectro de acción. De esta forma, una vez demostrado su efecto *in vitro*, se pueden seleccionar los productos a utilizar en condiciones *in vivo*. Sin embargo, los resultados obtenidos bajo condiciones *in vivo*, son muchas veces menos consistentes que los observados *in vitro*.

En un estudio realizado por Jamroz y colaboradores (2002), los autores demostraron que mediante la utilización de una mezcla de capsicum, cinamaldehído y carvacrol, se reducían los recuentos de *Escherichia coli* y de *Clostridium perfringens* en ciegos de pollos. Adicionalmente, en cerdos destetados, utilizando una mezcla muy similar, Manzanilla y colaboradores (2004) observaron un incremento de los niveles de *Lactobacillus* spp.

En cuanto al efecto de los extractos de plantas sobre los parámetros productivos, se han obtenido algunos resultados poco consistentes. Muchos estudios han demostrado un efecto positivo de la utilización de diferentes extractos de plantas sobre la ganancia media de peso (Velazques *et al.*, 2005, Cullen *et al.*, 2005; Kamel, 2001; Langhout, 2000). Sin embargo, existen estudios donde no se han observado estos efectos significativos (Botsoglou *et al.*, 2002). Esta falta de consistencia, se debe en gran parte a la variabilidad de los extractos de plantas presentes en el mercado. Además, son productos altamente heterogéneos y de difícil estandarización, ya que dependen del método de extracción, de las condiciones climáticas de la zona, de la región geográfica, de la edad de la planta, etc. Se cree que el efecto beneficioso sobre los parámetros productivos es debido a la acción que tienen sobre la microbiota intestinal. Tedesco y colaboradores (2005) detectaron una mejora de los parámetros productivos de los cerdos, conjuntamente con una reducción de los recuentos de las bacterias totales, de bacterias anaeróbicas, de *Escherichia coli* y de *Enterococcus* spp en los animales cuya dieta contenía extractos de plantas de *Paeonia lactiflora* o *Portulaca oleracea*.

Aunque la gran mayoría de extractos de plantas son utilizados en nutrición animal por sus propiedades antimicrobianas, también se ha demostrado que pueden tener un efecto antioxidante, antitoxigénico, antifúngico, etc. (Sakagami *et al.*, 2001; Suhr y Nielsen, 2003).

1.2.2.5. *Minerales*

El uso de minerales (especialmente el zinc y el cobre) en las dietas para animales de producción ha despertado mucho interés durante estos últimos años. Los minerales son elementos esenciales para determinadas funciones tanto en células eucariotas como en células procariontas, actuando como cofactores para un amplio rango de enzimas.

Aunque el mecanismo de acción de estos minerales no es del todo conocido, se ha comprobado que la inclusión de cobre y de zinc permite reducir la tasa de problemas digestivos y mejoran el crecimiento de los lechones. Dichos efectos positivos se observan cuando la adición de los minerales se realiza en dosis altas (farmacológicas) y no en dosis recomendadas para las necesidades nutricionales de los animales. En un trabajo realizado a principios de los años 90 ya se demostró, de forma clara, que la administración de zinc, en dosis comprendidas entre 2000 y 3000 ppm, mejoraba el crecimiento de los lechones recién destetados (Hahn y Baker, 1993). Estos resultados han sido confirmados posteriormente por otros trabajos que además, han encontrado que niveles altos del óxido de zinc mejoran la consistencia de las heces y alteran el color de las mismas (Hill *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 2001).

Existe poca información del efecto de los minerales sobre la microbiota intestinal y la existente se basa en el análisis del efecto de los minerales sobre las heces. Utilizando altas dosis de óxido de zinc se mantiene una alta diversidad de los coliformes (Katouli *et al.*, 1999), reduciendo la susceptibilidad de los cerdos a infecciones por *Escherichia coli* (Mores *et al.*, 1998). Curiosamente, se ha observado que la inclusión de este mineral reduce los recuentos de bacterias del ácido láctico e incrementa el número coliformes y enterococci (Hojberg *et al.*, 2005). En aves, se ha observado que la inclusión de 140 a 180 ppm de Zn mejora la supervivencia de aves de puesta cuando estas se infectan con *Escherichia coli* (Flinchum *et al.*, 1989). También se han observado modificaciones sobre la microbiota intestinal de los cerdos cuando se utiliza el cobre. Concretamente se ha demostrado una reducción de las bacterias del ácido

láctico a lo largo de todo el tracto digestivo, así como una reducción de la cantidad de coliformes a nivel de colon (Hojberg *et al.*, 2005).

1.2.2.6. Otros

De los muchos aditivos utilizados en la alimentación de los cerdos, los enzimas serían uno de los más importantes. Su incorporación en las raciones se ha utilizado principalmente para suplir las deficiencias enzimáticas de los lechones y mejorar la digestibilidad de la dieta. Mediante la degradación de diferentes substratos de la dieta (especialmente de PNAS) se limitan las fermentaciones excesivas y las alteraciones del equilibrio microbiano. Además, mediante la acción de las enzimas se disminuye la viscosidad de la digesta. Sin embargo, las mejoras en la digestión y en el ambiente intestinal obtenidas para lechones no son comparables con las obtenidas en las aves (Patridge, 2001).

La incorporación de los nucleótidos en las dietas de los animales también juega un papel importante, tanto sobre el desarrollo del epitelio intestinal (Uauy *et al.*, 1994), como sobre el sistema inmunitario del tracto digestivo (Kulkarni *et al.*, 1986; Rueda *et al.*, 2002). En referencia al efecto de los nucleótidos sobre la microbiota intestinal existe escasa información. Se ha observado una mejora de la consistencia de las heces tras añadir nucleótidos a las dietas de cerdos, sin que se alterara el grado de diversidad microbiana ni en el íleon ni en el ciego (Andrés, 2006).

1.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL

1.3.1. Métodos directos

Definimos como métodos directos aquellos que permiten el estudio cuantitativo y/o cualitativo de la microbiota mediante el cultivo o la detección directa de los mismos microorganismos.

1.3.1.1. Cultivos y pruebas bioquímicas

Tradicionalmente la composición de la microbiota intestinal ha sido estudiada mediante la utilización de cultivos bacterianos (aeróbicos y/o anaeróbicos) y su subsiguiente caracterización fenotípica. Además, para el estudio de determinados microorganismos, se utilizan medios de cultivo selectivos que permiten el crecimiento de uno o de unos pocos tipos de microorganismos.

Mediante estas técnicas, durante los años 70 se realizaron numerosos estudios describiendo nuevos géneros de especies bacterianas que habitan en el tracto digestivo (Finegold *et al.*, 1983; Moore y Holdeman, 1974). En estos estudios, se observó que la mayoría de microorganismos que habitan el tracto digestivo de los cerdos son bacterias Gram-positivas, anaeróbicas estrictas. Utilizando los cultivos bacterianos se demostró que bacterias del género *Streptococcus* spp se podían aislar abundantemente (27 % del total de bacterias aisladas). Otros géneros cultivados a partir de heces de cerdo fueron *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Bacteroides* y *Peptostreptococcus* (Moore *et al.*, 1987).

La utilización de los cultivos bacterianos para el estudio de la microbiota intestinal presenta algunas limitaciones. El aislamiento de los microorganismos es laborioso y presenta una baja sensibilidad. De hecho, en la actualidad, con el desarrollo de nuevas técnicas más sensibles, se ha estimado que el porcentaje de bacterias cultivables sobre el total de la población bacteriana intestinal de los seres humanos esta entre el 10 y el 50 % (Suau *et al.*, 1999; Zoetendal *et al.*, 1998). Algunos autores han estimado que entre el 60 y el 80 % de las bacterias del tracto digestivo son no cultivables (Langendijk *et al.*, 1995) y que existe un grupo abundante de bacterias desconocidas. Con estos datos, parece obvio que la combinación de cultivos bacterianos con técnicas moleculares va a ser esencial para la obtención de un mejor conocimiento de la microbiota intestinal.

1.3.1.2. Métodos moleculares

El progreso en estos últimos años de diferentes técnicas moleculares ha permitido ampliar el conocimiento de la composición de la microbiota del tracto gastrointestinal. Estas aproximaciones se han realizado mayoritariamente mediante el estudio de la

secuencia del RNA de la sub-unidad pequeña del ribosoma bacteriano (también llamado 16S RNA ribosomal [16S rRNA]) o de su propio gen (16S rDNA). Esta molécula es actualmente la más utilizada para el estudio de las relaciones filogenéticas entre grupos bacterianos, ya que contiene regiones altamente conservadas a lo largo de la evolución, conjuntamente con otras regiones variables que permiten la diferenciación entre microorganismos (Olsen *et al.*, 1986).

Dentro de este amplio grupo de técnicas y en función de los objetivos, se podrían clasificar en dos grandes grupos: técnicas cuantitativas y cualitativas.

1.3.1.2.1. Métodos moleculares cualitativos

Existen diferentes técnicas moleculares para el estudio de la composición de la microbiota intestinal de una forma cualitativa. Entre ellas, las más utilizadas son: el clonaje y la secuenciación, el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*; RFLP) y la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*; DGGE).

1.3.1.2.1.1. Clonaje y secuenciación

La utilización del clonaje, la secuenciación y el análisis filogenético del gen del 16S rRNA, se ha convertido en una poderosa herramienta para el estudio de los microorganismos que habitan en el tracto gastrointestinal. Esta técnica ha sido utilizada para analizar la diversidad bacteriana del tracto digestivo de humanos, cerdos, caballos, etc. (Daly *et al.*, 2001; Hold *et al.*, 2002; Leser *et al.*, 2002; Suau *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003). En seres humanos, y como ya se ha apuntado anteriormente en esta introducción, se demostró mediante esta técnica que únicamente un 24 % de las especies moleculares correspondían a microorganismos ya conocidos y reveló la existencia de un gran número de nuevas especies bacterianas (Suau *et al.*, 1999). En este mismo estudio Suau y colaboradores (1999) demostraron que el 95 % de las secuencias encontradas correspondían a 3 grupos filogenéticos: *Bacteroides* spp, *Clostridium coccoides* y el subgrupo *Clostridium leptum*, siendo las bacterias del cluster *Clostridium XIVa* las más abundantes (46,3 %), seguidas del grupo *Bacteroides* (26,4 %). Otros autores han obtenido resultados similares (Tabla 1.2.) (Hold *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003).

Tabla 1.2. Tabla comparativa de la distribución de las especies bacterianas en el tracto digestivo de los humanos, caballos y cerdos mediante la utilización del clonaje y la secuenciación del gen 16S rRNA (adaptado de (Wang *et al.*, 2003)).

Especie del origen	Muestras analizadas				
	Humana (35-68 años)	Humana (70-82 años)	Humana (45 años)	Equina	Porcina
Localización en el tracto gastrointestinal	Mucosa del íleon, del colon proximal y del colon distal	Mucosa del colon	Heces	Mucosa y contenido digestivo del colon	Contenido digestivo del íleon, del ciego y del colon
Grupos					
<i>Proteobacteria</i> (%)	20,9	2,7	1,8	2	5,3
<i>Bacteroidetes</i> (%)	27,7	26,4	30,9	20	11,2
<i>Clostridium</i> cluster IV (%)	8,9	14,5	20,1	8	29,1
<i>Clostridium</i> cluster XIVa (%)	24,7	46,3	44	37	33,3
<i>Clostridium</i> otros clusters (%)	14,3	5,4	2,0	14	4,0
<i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i> (%)	1,1	0	0,7	2	12,3
Otras secuencias (%)	2,4	4,7	0,5	17	4,8
Número de secuencias	361	110	284	272	4720
Presencia (%)	82	~80	85	~80	97,8
Autores	Wang y col. 2003	Hold y col. 2002	Suau y col. 1999	Daly y col. 2001	Leser y col. 2002

Estos trabajos, presentan la ventaja adicional de que la secuencia de ADN obtenida puede ser incorporada a las bases de datos existentes y utilizada posteriormente en otros estudios. Sin embargo, la utilización de la clonación y secuenciación para el estudio de la microbiota intestinal es un trabajo largo y tedioso, especialmente cuando se pretende trabajar con un gran número de muestras. Además, como todos los métodos dependientes de PCR, los resultados pueden estar sometidos a desviaciones derivadas de esta misma técnica.

1.3.1.2.1.2. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) o de los fragmentos terminales de restricción (PCR-tRFLP).

Estas técnicas permiten comparar la composición de una comunidad bacteriana mediante el estudio del polimorfismo de la longitud de los diferentes fragmentos de restricción del gen del 16S rRNA o del gen que se haya utilizado. Concretamente, estas técnicas están basadas en la detección de variaciones en la longitud de los fragmentos de restricción que se producen cuando el ADN se trata con endonucleasas de restricción. Las diferencias en el tamaño de los fragmentos son consecuencia de la variación genética en relación con la presencia o ausencia de determinados sitios de reconocimiento o puntos de corte.

Brevemente, tras la extracción de ADN bacteriano, éste es amplificado mediante PCR con cebadores universales frente al gen del 16S rRNA. Estos cebadores pueden no estar marcados, caso de la PCR-RFLP, o marcados fluorescentemente, en el caso de la PCR-tRFLP. El producto de amplificación es sometido a una o a varias digestiones con diferentes enzimas de restricción. Los productos de la digestión pueden ser visualizados en un gel de agarosa (PCR-RFLP) con fluorocromos de intercalación, como el bromuro de etidio, o visualizados mediante un gel de poliacrilamida de alta resolución, utilizando para ello un equipo de secuenciación.

Esta técnica ha sido empleada para el estudio de la microbiota del tracto digestivo del cerdo (Leser *et al.*, 2000). En este estudio, Leser y colaboradores (2000) demostraron la existencia de patrones de bandas comunes en todas las dietas estudiadas, mientras que detectaron algunos fragmentos específicos para cada una de las dietas analizadas. Tras la infección de estos animales con *Brachyspira hyodysenteriae*, los autores detectaron cambios en los patrones de bandas. Concretamente, desaparecieron un total de 39 fragmentos en uno o más grupos y apareciendo 18 nuevos fragmentos, sugiriendo una desestabilización de la comunidad bacteriana.

En los seres humanos, la utilización de la PCR-tRFLP, con una posterior simulación informática, mostró que tanto el yeyuno como el íleon contienen comunidades compuestas mayoritariamente por streptococci, lactobacilli, Gamma-proteobacterias, *Enterococcus* spp y el grupo *Bacteroides* spp. En cuanto a los grupos de *Clostridium coccoides* y *Clostridium leptum*, éstos fueron encontrados predominantemente a nivel de ciego y heces (Hayashi *et al.*, 2005). También se han detectado diferencias entre las poblaciones bacterianas que habitan en la mucosa y el lumen cecal de las aves de corral (Gong *et al.*, 2002).

La PCR-RFLP es más sencilla y menos laboriosa cuando se compara con el clonaje y la posterior secuenciación. Sin embargo presenta ciertos inconvenientes como son la necesidad de la secuenciación para identificar un determinado fragmento y la variabilidad generada por los sistemas de extracción del ADN, por los cebadores utilizados para la PCR y por los diferentes enzimas de restricción utilizados, etc.

1.3.1.2.1.3. *Gradiente de desnaturalización (DGGE) o gradiente de temperatura (TGGE) del gel de electroforesis*

Las técnicas del PCR-DGGE o del PCR-TGGE han sido ampliamente utilizadas para el estudio de la composición de la microbiota intestinal. Mediante esta técnica, el gen del 16S rRNA es amplificado mediante una PCR y posteriormente visualizado mediante un gel de poliacrilamida. En el caso de utilizar DGGE, los diferentes productos de la amplificación van a ser separados mediante la utilización de un incremento lineal del gradiente de agentes desnaturalizantes como la formamida o la urea, mientras que en el caso del TGGE la separación se va a producir por un incremento de la temperatura. La separación de los productos de la amplificación depende de la concentración de guanina y citosina que tenga la secuencia de ADN. De este modo, con esta técnica, fragmentos con la misma longitud van a poder ser separados en función de su estabilidad química o térmica (Fisher y Lerman, 1979).

Esta técnica ha sido empleada para estudiar la diversidad de las poblaciones bacterianas del tracto digestivo de diferentes especies animales (Simpson *et al.*, 2002; Simpson *et al.*, 1999). En un estudio realizado por Simpson y colaboradores (2002), donde se analizaban muestras de heces de perros, los autores demostraron que mientras la gran mayoría de las bandas eran encontradas en todos los individuos, había algunas de ellas específicas de la raza, de la dieta o de la edad del animal. Además, en este mismo estudio, los autores observaron que el perfil de las bandas se agrupaba en función de la edad de los animales (jóvenes *vs* viejos) y en función del tamaño del animal (perros grandes *vs* perros pequeños). En el caso de los cerdos, también existen estudios donde se ha empleado la técnica del DGGE para el estudio de la composición bacteriana en los diferentes compartimentos de tracto digestivo (Simpson *et al.*, 1999). Así, en este estudio, Simpson y colaboradores (1999) demostraron que la diversidad bacteriana era muy similar dentro de un tramo intestinal y el adyacente. Adicionalmente, también observaron diferencias en el patrón de bandas en función de la edad de los animales (cerdos lactantes, destetados y adultos). Más recientemente, otros autores han utilizado esta técnica para determinar los cambios producidos tras la administración de diferentes fuentes de carbohidratos. Konstantinov y colaboradores (2003) demostraron que los lechones alimentados con carbohidratos fermentables (pulpa de remolacha y

fructooligosacáridos) tenían una mayor diversidad bacteriana y una más rápida estabilización de la comunidad bacteriana del tracto digestivo.

Al igual que con la técnica de la PCR-tRFLP, la utilización del DGGE o TGGE permite trabajar con un gran número de muestras de una forma relativamente sencilla.

1.3.1.2.1.4. Análisis de la diversidad microbiana y generación de los dendrogramas

Mediante la utilización de estas técnicas moleculares se va a poder calcular el grado de diversidad bacteriana. Concretamente, en el caso de utilizar técnicas como la PCR-RFLP o bien la PCR-DGGE, a partir del gel se van a poder generar bases de datos con la movilidad relativa de las bandas --que se correlaciona con el tamaño de cada banda (en pares de bases), en el caso de la PCR-RFLP, o con el contenido G:C, en el caso de la PCR-DGGE-- y la intensidad de la banda. Con estos valores se va a poder calcular el grado de diversidad bacteriana.

El término **diversidad microbiana** fue desarrollado originalmente en el ámbito de la macroecología. Actualmente, este término también es utilizado en el campo de la microbiología y engloba dos conceptos: la riqueza (número de especies dentro de una comunidad) y su abundancia. Existen varios índices para el cálculo de la diversidad microbiana. Concretamente en esta tesis se calculó mediante el número total de bandas obtenidas en cada muestra y mediante el índice de Shannon – Weaver (1963). El índice de Shannon - Weaver se calcula mediante la función: $H' = -\sum P_i \log P_i$, donde P_i es la probabilidad de encontrar una determinada banda en un carril. P_i es calculada mediante la formula $P_i = n_i/n_t$ donde n_i es la altura de un pico determinado y n_t es el sumatorio de todos los picos de una curva densitométrica (McCracken *et al.*, 2001; Shannon y Weaver, 1963).

Para visualizar **la similitud** entre las diferentes poblaciones bacterianas se pueden construir diferentes dendrogramas mediante el cálculo la distancia de Manhattan (en esta tesis, para el cálculo del grado de similitud se tiene en cuenta tanto la presencia/ausencia de un banda como su intensidad, (Kaufmann y Rousseeuw, 1990)), el coeficiente de Dice (solo tiene en cuenta la presencia/ausencia de una banda), etc. Con estos valores se van a poder generar los dendrogramas mediante la utilización de un

software y la selección de diferentes algoritmos matemáticos (neighbour-joining, UPGMA...).

1.3.1.2.2. Métodos moleculares cuantitativos

Dentro de este grupo hay que destacar técnicas como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y la PCR cuantitativa a tiempo real. Con ambas técnicas vamos a poder medir la abundancia relativa de una familia, de un género o de una especie bacteriana.

1.3.1.2.2.1. Hibridación in situ fluorescente (FISH)

La hibridación *in situ* fluorescente se basa en la utilización de sondas marcadas con diferentes fluorocromos que hibridan en el 16S rRNA. En función de la especificidad de la sonda, se pueden contabilizar diferentes grupos. Así, si se utilizan sondas poco específicas se obtiene la cantidad de bacterias totales, mientras que cuando se utilizan sondas más específicas se puede llegar a cuantificar determinadas especies bacterianas (Moter y Gobel, 2000).

Una vez realizada la hibridación, el conteo de las células fluorescentes se puede realizar de dos modos diferentes. El más comúnmente utilizado es el conteo manual o semiautomático mediante la utilización de un microscopio de epifluorescencia. Sin embargo, este sistema es lento y laborioso. Por este motivo, actualmente se intenta complementar esta técnica con un citómetro de flujo, permitiendo así conteos más rápidos y sensibles. Una ventaja muy clara de la utilización de esta técnica es que no se produce ninguna desviación por la extracción o la PCR. Sin embargo, es una técnica que está influenciada por el estatus metabólico de las bacterias.

Existen numerosos estudios científicos donde se caracteriza la población bacteriana de las heces de los seres humanos mediante la técnica del FISH (Franks *et al.*, 1998; Harmsen *et al.*, 2002). Mediante la revisión de estos estudios se puede extraer la información presentada en la Tabla 1.3..

Tabla 1.3. Cantidad y porcentajes de diferentes grupos bacterianos encontradas en las heces de los seres humanos mediante la utilización de diferentes sondas fluorescentes (Franks *et al.*, 1998; Harmsen *et al.*, 2002).

Sonda	Bacteria	Contajes	Porcentaje	Autores
Bfra-0602 Bdis-0656	<i>Bacteroides fragilis</i> + <i>Bacteroides distasonis</i>	5,4 x10 ¹⁰ células/g de heces	20%	Frank <i>et al.</i> 1998
Erec-0482	Específica para Clostridia y Eubacteria del grupo Clostridium cluster XIVa y XIVb	7,2 x10 ¹⁰ células/g de heces	29%	Frank <i>et al.</i> 1998
Bif-0164	Bifidobacteria	9,4 x10 ⁹ células/g de heces	3%	Frank <i>et al.</i> 1998
Strc-0493	<i>Streptococcus</i> y <i>Lactococcus</i>	-	<1%	Frank <i>et al.</i> 1998
Chis-0150	<i>Clostridium histolytium</i>	-	<1%	Frank <i>et al.</i> 1998
Rflav-0729 Rbrom-0730	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> <i>Ruminococcus bromiae</i>	1,2 x10 ¹⁰ células/g de heces	10,3%	Harsem <i>et al.</i> 2002
Ecyl-0387	<i>Eubacterium cylindois</i>	2,3 x10 ⁹ células/g de heces	1,8%	Harsem <i>et al.</i> 2002
Ehal-1469	<i>Eubacterium Halli</i>	8,5 x10 ⁹ células/g de heces	3,8%	Harsem <i>et al.</i> 2002
Veil-0223	<i>Veillonella</i>	3,3 x10 ⁷ células/g de heces	0,08%	Harsem <i>et al.</i> 2002
Phasco-0741	<i>Phascolarctobacterium</i>	8,8 x10 ⁸ células/g de heces	0,60%	Harsem <i>et al.</i> 2002
Lach-0571	<i>Lachnospira</i>	4,9 x10 ⁹ células/g de heces	3,60%	Harsem <i>et al.</i> 2002

La gran mayoría de los estudios realizados en la especie humana se realizan a partir de muestras de heces. Sin embargo, en cerdos, existen trabajos donde se ha utilizado la técnica del FISH para el estudio de la composición bacteriana a lo largo de todo el tracto digestivo (Castillo *et al.*, 2007b). De este estudio, se puede extraer que bacterias del grupo *Clostridium* cluster XIVa (10 - 19 %), *Clostridium* cluster IX (4,7 - 7,7 %) y bacterias del grupo *Bacteroides/Prevotella* (4,5 y un 10 %) representan los grupos bacterianos predominantes en el intestino grueso de los cerdos, mientras que microorganismos del género *Streptococcus* spp y *Lactobacillus* spp representan entre un 0,5 y un 2 % de la población bacteriana total (Figura 1.3.).

1.3.1.2.2.2. PCR cuantitativa a tiempo real.

Esta técnica se basa en la detección y cuantificación del producto amplificado en cada uno de los ciclos de amplificación de la reacción de la cadena de la polimerasa. Para poder determinar el número inicial de copias de ADN de la muestra analizada, es necesario construir una curva de calibración mediante la utilización de unos estándares con un número de copias de ADN conocidas.

Actualmente los dos sistemas más utilizados para la cuantificación del ADN son el sistema SYBR-Green[®] y el sistema Taqman[®]. Mediante el sistema SYBR-Green[®], los fluorocromos solo emiten fluorescencia cuando éstos están unidos a una doble cadena de ADN. Mediante este sistema, es necesario que la reacción de amplificación sea altamente específica ya que cualquier ADN amplificado incluso los dímeros de los cebadores van a ser contabilizados como ADN amplificado.

En cuanto al sistema Taqman[®], permite detectar únicamente las moléculas de ADN que son objetivo de nuestra cuantificación. Este sistema se basa en la utilización de una sonda marcada con un fluorocromo y un secuestrador de fluorescencia. De esta forma, cuando la enzima Taq-polimerasa llega donde está la sonda, ésta se rompe y separa el fluorocromo del secuestrador. Es la separación de los fluorocromos lo que provoca la emisión de fluorescencia.

Esta metodología ha sido aplicada para el estudio de la composición de la microbiota del tracto digestivo de los seres humanos (Matsuki *et al.*, 2002), de los rumiantes (Tajima *et al.*, 2001), de las aves (Selim *et al.*, 2005) y de los cerdos (Castillo *et al.*, 2006a; Castillo *et al.*, 2006b; Hill *et al.*, 2005). Particularmente en el cerdo, Hill y colaboradores (2005) mediante una PCR a tiempo real, cuantificaron diferentes bacterias como *Clostridium* spp, *Streptococcus alactolyticus* y *Lactobacillus amylovorus*. También en cerdos, Castillo y colaboradores (2007a) mediante la utilización de una PCR cuantitativa determinaron la cantidad de lactobacilli y enterobacterias y demostraron que los cerdos destetados presentaban una mayor ratio enterobacteria: lactobacilli que los cerdos lactantes.

1.3.2. Métodos indirectos

La utilización de los métodos indirectos nos permite el estudio de la microbiota gastrointestinal mediante la determinación de su actividad metabólica. Estos métodos pueden basarse en la concentración de productos de la fermentación (AGVs), la concentración de bases púricas o bien diferentes actividades enzimáticas.

1.3.2.1. Ácidos grasos volátiles (AGVs)

De la fermentación de los carbohidratos se obtienen diferentes ácidos grasos volátiles (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico) conjuntamente con otros productos intermedios (lactato y succinato) y gases (hidrógeno y metano). La cuantificación de estos productos puede correlacionarse con la actividad microbiana o metabólica que tiene lugar en el intestino. Por este motivo, se han utilizado los cambios en el perfil de AGVs para evaluar la acción de diferentes carbohidratos sobre la población bacteriana. Como se ha observado en numerosos estudios *in vitro*, las proporciones de AGVs van a cambiar en función del sustrato utilizado (Cummings y Macfarlane, 1991). Por ejemplo se ha descrito un incremento de las concentraciones de ácido butírico y ácido propiónico en paralelo con una mayor actividad amilolítica (Duncan *et al.*, 2003). También se han correlacionado aumentos en las concentraciones totales de AGVs con una mayor actividad de los microorganismos del ácido láctico (Jiang y Savaiano, 1997).

1.3.2.2. Bases púricas

La cantidad de bases púricas de la digesta ha sido tradicionalmente utilizada como marcador microbiano (Zinn y Owens, 1986). Debido a que los ácidos nucleicos de los alimentos tienen una rápida degradación en el tracto digestivo, la determinación de las bases púricas de la digesta puede ser utilizada como marcador microbiano. Esta técnica fue originariamente utilizada para el estudio de la síntesis microbiana de los rumiantes (Zinn y Owens, 1986). Más recientemente, esta determinación ha sido empleada en animales monogástricos. Así, en un estudio realizado por Martínez-Puig y colaboradores (2003), los autores demostraron que los cerdos alimentados con dietas con alto contenido en almidón resistente presentan mayores cantidades de bases púricas en heces.

1.3.2.3. Actividades enzimáticas

La determinación de diferentes actividades enzimáticas microbianas nos permite estudiar de forma indirecta la microbiota que habita en el tracto digestivo. Mediante esta técnica podemos obtener una aproximación de la actividad metabólica de determinados grupos bacterianos. Habitualmente se cuantifican las actividades amilasa y celulasa.

Estas actividades nos permiten cuantificar la actividad de la población bacteriana capaz de fermentar este tipo de sustratos. Morales y colaboradores (2002) detectaron cambios en la actividad amilolítica y celulolítica de la microbiota del intestino grueso en cerdos alimentados con dietas a base de maíz y sorgo.

CAPÍTULO 2
OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

En los últimos años se han realizado muchos avances en la producción porcina para mejorar el estatus sanitario de las granjas. Sin embargo, actualmente, todavía se observan problemas digestivos que se concentran especialmente durante la fase del destete de los lechones y durante la entrada en la fase del engorde. Además, hay que considerar que la problemática digestiva podría empeorar con las recientes prohibiciones del uso de los antibióticos como promotores de crecimiento.

Esta tesis forma parte del proyecto AGL2001-2624-C02-02 que pretende profundizar en el conocimiento del proceso digestivo en la especie porcina y, más concretamente, sobre el efecto de diferentes fuentes de carbohidratos, como componente principal de la dieta, en los procesos digestivos, la microbiota intestinal y el sistema inmune de los cerdos. Concretamente, esta tesis está focalizada en el estudio de la composición de la microbiota intestinal a lo largo del tracto digestivo y el efecto de diferentes dietas sobre las poblaciones bacterianas.

El presente trabajo tiene como objetivo principal estudiar, mediante diferentes técnicas de biología molecular, la composición de la microbiota del tracto digestivo de los cerdos y los cambios que en ella se producen en diferentes condiciones. Para ello, se consideró oportuno:

1. Evaluar las poblaciones bacterianas a lo largo del tracto gastrointestinal en cerdos recién destetados y alimentados con piensos suplementados con diferentes aditivos mediante la utilización de la técnica del polimorfismo de la longitud de los diferentes fragmentos de restricción (PCR-RFLP).
2. Estudiar la adaptación de las poblaciones microbianas del tracto gastrointestinal del cerdo a diferentes fuentes de fibra dietética mediante la utilización de diferentes técnicas como la comparación de la longitud de los diferentes fragmentos de restricción (PCR-RFLP), la PCR a tiempo real y la hibridación *in situ* fluorescente (FISH).
3. Estudiar el efecto de una infección experimental con una bacteria entérica patógena sobre la población microbiana del intestino del cerdo.

CAPÍTULO 3
CAMBIOS EN LAS POBLACIONES BACTERIANAS DEL TRACTO
GASTROINTESTINAL EN CERDOS RECIEN DESTETADOS Y
ALIMENTADOS CON PIENSOS SUPLEMENTADOS
CON DIFERENTES ADITIVOS

3.1. Introducción

El destete es uno de los periodos más críticos del ciclo productivo de los cerdos. Este hecho se debe a que, en este corto periodo de tiempo, el animal se enfrenta a muchos cambios, tanto sociales, como ambientales y dietéticos. La combinación de estas nuevas circunstancias genera estrés a los animales, favoreciendo así la ocurrencia de diferentes enfermedades bacterianas y víricas (Wallgren y Melin, 2001). Durante muchos años, los antibióticos promotores del crecimiento (AGPs) han sido utilizados para mejorar las ganancias de peso de los animales y para controlar el sobrecrecimiento de las bacterias patógenas, especialmente durante este crítico periodo (Cromwell, 2002; Jensen, 1998). Sin embargo, actualmente existe una gran preocupación en cuanto al desarrollo de resistencias antimicrobianas y, por este motivo, la Unión Europea ha prohibido la utilización de los AGPs en producción animal (Reglamento 2821/98/CE). Este hecho ha provocado un interés en mejorar el conocimiento del proceso digestivo, y en concreto, de la composición de la microbiota intestinal de los cerdos, con el fin de encontrar nuevas estrategias alimentarias que ayuden a evitar infecciones causadas por bacterias patógenas y, en definitiva, de mantener a los animales en un mejor estado sanitario. Esta necesidad de profundizar en el conocimiento del ecosistema del tracto digestivo ha coincidido con la aparición e implementación de técnicas moleculares en diferentes campos de la ciencia, también en la microbiología, que permiten tener una visión mucho más amplia de estos sistemas complejos.

Actualmente, existen diferentes aditivos, como los extractos de plantas o acidificantes, que se están utilizando como alternativas a los antibióticos promotores del crecimiento. El amplio espectro antimicrobiano de algunos extractos de plantas como el timol, el orégano y la canela, ha sido claramente demostrado en diferentes estudios *in vitro* (Dorman y Deans, 2000; Smith-Palmer *et al.*, 1998). Sin embargo, los resultados son menos consistentes bajo condiciones *in vivo*. Es por este motivo que se necesita más información sobre la acción de estos componentes *in vivo* para considerar los extractos de plantas como alternativas reales a los antibióticos promotores del crecimiento. Por otro lado, la acidificación de la dieta mediante el uso de ácidos orgánicos, o de sus sales, constituye otra alternativa a los AGPs. Estos productos mejoran los rendimientos productivos de los animales, tienen capacidad antimicrobiana y facilitan la digestión de proteínas (Partanen y Mroz, 1999; Paulicks *et al.*, 1996). Además, en un estudio

realizado por Galfi y Bokori (1990), los autores demostraron que mediante la suplementación de la dieta con butirato de sodio, se reducía la cantidad de coliformes y se incrementaba el número de *Lactobacillus* spp en el íleon. Sin embargo, existen pocos trabajos donde se analice el efecto global de los acidificantes sobre el ecosistema bacteriano del tracto digestivo.

Este primer trabajo persigue principalmente dos objetivos. En primer lugar, desarrollar la técnica de PCR-RFLP para valorar la microbiota del tracto digestivo en la especie porcina y, en segundo lugar y a través del uso de esta técnica, estudiar el efecto de diferentes aditivos (un acidificante, un extracto de plantas y un antibiótico) sobre las poblaciones bacterianas del tracto digestivo.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Animales, alojamiento y manejo

La prueba fue realizada en la unidad experimental de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, con la aprobación previa de la Comisión de Ética para la Experimentación Animal y Humana de la misma universidad. Todos los procedimientos relacionados con animales fueron realizados de acuerdo con la normativa europea (Directiva 86/609/CEE).

Un total de treinta y dos cerdos recién destetados, cruzados de Pietrain x (Landrace x Large White), machos y hembras mezclados, y procedentes de diez camadas diferentes, fueron seleccionados de una granja comercial. Estos cerdos fueron destetados a los 20 ± 2 días de edad, con un peso medio de $5,9 \pm 0,7$ kg. Los animales fueron distribuidos en 4 grupos (8 animales por dieta) teniendo en cuenta su peso inicial y su camada de origen, para obtener grupos homogéneos. Todos los animales fueron alojados en una sala con el ambiente controlado, donde la temperatura fue gradualmente reducida de 29 a 25 °C, durante el periodo de 3 semanas de duración del ensayo.

3.2.2. Dietas y diseño experimental

Los cerdos fueron alimentados con cuatro dietas diferentes. El grupo control (grupo CT) recibió una dieta formulada a base de cereales (60 %), subproductos de la leche (20 %), concentrado proteico de soja (6 %), harina de pescado de baja temperatura (5 %), harina de soja 44 % (4 %) y grasa de soja (4 %) como principales ingredientes (ver Tabla 3.1.). Los tres grupos restantes recibieron la misma dieta añadiendo tres aditivos diferentes: 0,04 % de avilamicina (grupo AB), 0,3 % de butirato sodio (grupo AC) o 0,03 % de un extracto de plantas comercial (5% carvacrol (*Origanum spp*), 3 % cinnamaldehído (*Cinnamomum spp*) y 2 % oleoresina de capsicum (*Capsicum annum*) (grupo XT). Los animales fueron alimentados *ad libitum* con las dietas experimentales y con libre acceso al agua durante tres semanas.

3.2.3. Controles y toma de muestras

Los animales fueron pesados semanalmente y se calculó la ganancia media diaria de peso (ADG). Después de tres semanas con las dietas experimentales, los cerdos fueron sacrificados mediante una inyección intravenosa de pentobarbital sódico (200 mg/kg peso vivo, Dolethal, Vetoquinol, S.A., Madrid, España). El sacrificio se realizó en 2 días (día 19 y día 21 del estudio), a razón de 4 animales/grupo/día. Tras el sacrificio de los animales, se abrió el abdomen y se extrajo todo el tracto digestivo. Se recogieron muestras del contenido luminal del estómago (ST), yeyuno proximal (PJ), yeyuno distal (DJ), íleon (I), ciego (C), colon proximal (PC), colon distal (DC) y recto (R). Se recogió aproximadamente 1 g de digesta de cada uno de los tramos del tracto digestivo en tubos estériles con 3 mL de etanol al 98 % y fueron almacenados a 4°C hasta su procesamiento (Castillo *et al.*, 2007b; Murphy *et al.*, 2002).

Tabla 3.1. Composición (g/kg) de la dieta control (en materia fresca) y contenido de nutrientes de las dietas (en g/kg de materia fresca).

Ingredientes	g/kg
Maíz	277,8
Cebada	300,0
Concentrado de soja 44 %	40,0
Grano de soja extrusionado	40,0
Concentrado de proteína de soja ¹	60,0
Harina de pescado LT ²	50,0
Suero desecado	40,0
Suero ácido ³	150,0
Gluten de trigo	6,8
Sepiolita (en arena)	10,0
Fosfato bicálcico	11,0
L-lisina HCl	4,4
DL-metionina	2,7
L-treonina	1,9
L-triptófano	0,4
Cloruro de colina 50%	2,0
Premezcla de vitaminas y minerales ⁴	3,0

Nutrientes	g/kg
Materia seca	894,0
Proteína cruda	184,1
Fibra bruta	28,0
Extracto etéreo	51,1
Ca	6,4
Na	2,8
P disponible	4,0
Lisina	13,6
Metionina	6,2
Triptófano	2,5
Treonina	9,1
Energía metabolizable Mcal/kg	3,3

¹ Soycomil (Indukern S.A., Barcelona).

² Harina de pescado LT: producto obtenido eliminando la mayor parte del agua y algunos aceites del pescado mediante calor a bajas temperaturas (< 70 °C) y comprimido.

³ Suero ácido: producto obtenido mediante desecación del suero fresco (derivado de la fabricación de quesos) que han sido pasteurizados

⁴ Aporta por kg de pienso: 13500 UI de vitamina A, 2000 UI de vitamina D3, 80 mg de vitamina E, 3 mg de vitamina B1, 8 mg de vitamina B2, 5 mg de vitamina B6, 0,04 mg de vitamina B12, 40 mg de ácido nicotínico, 15 mg de pantotenato cálcico, 1,3 mg de ácido fólico, 0,15 mg de biotina, 4 mg de vitamina K3, 120 mg de Fe como hierro carbonato, 175 mg de Cu como sulfato de cobre, 110 mg de Zn como óxido de zinc, 65 mg de Mn como sulfato de manganeso, 1 mg de I como iodato potasio, 0,10 mg de Se como selenito sódico.

3.2.4. Procesado de las muestras

3.2.4.1. Extracción del ADN y técnica de PCR

Previamente a la extracción del ADN, se realizaron 2 lavados de cada muestra con agua de peptona estéril (400 mg de contenido digestivo). El ADN fue extraído mediante la utilización del Mini kit QIAamp DNA Stool (Qiagen Inc., Chatsworth, Calif) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. En una fase inicial del método de extracción, se añadieron 140 μ l de una solución con 10 mg/mL de lisozima en Tris-EDTA buffer (pH 8,0) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) al tampón de lisis y se incubó a 37°C, durante 30 minutos, para mejorar la extracción del ADN de las bacterias Gram-positivas. Al final del método de extracción, se añadieron 2 μ l de Ribonuclease-A y 4 μ l de 0,8 μ g/mL BSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) en cada muestra, para eliminar restos de RNA y estabilizar el DNA obtenido. El ADN fue almacenado a -20°C hasta la realización de la PCR.

La PCR fue realizada mediante la utilización de la Master mix AmpliTaq Gold[®] (Applied Biosystems, CA, USA) en un volumen total de 50 μ l. La PCR consistía en 0,05 U/ μ l de AmpliTaq Gold polymerase, 0,8 μ M de cada primer, 0,1% de Tween 20, 5 μ l de ADN (~100 ng) y agua autoclavada de 18 M Ω . El gen del 16S rRNA fue amplificado mediante la utilización de los cebadores: 357fm (5'-CTACGGGAGGCAGCAGT-3') y 907rm (5'-CCGTCWATTCMTTGTGAGTTT-3') diseñados por Lane (1991) con alguna modificación menor. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: activación de la TaqGold a 94°C (4 min); 35 ciclos de desnaturalización a 94°C (1 min), annealing a 45°C (1 min) con un incremento de 0,1°C por ciclo, extensión a 72°C (1 min 15 s) y una extensión final a 72°C (15 min).

3.2.4.2. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Cada producto de la PCR fue digerido mediante 4 enzimas de restricción: *AluI*, *RsaI*, *HpaII* y *CfoI* (F.Hoffmann-LaRoche Ltd Group, Basel, Switzerland) en cuatro reacciones independientes. La mezcla (10 μ l en total) contenía 8 μ l del producto de la PCR, 1 μ l del buffer SA (F.Hoffmann-La Roche Ltd Group, Basel, Switzerland) y 1 μ l (10 U) de cada enzima de restricción. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a

37°C. Los diferentes fragmentos obtenidos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa de alta resolución al 2 % (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y visualizados mediante la tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). El marcador “Step ladder 50 bp” (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) fue utilizado como marcador del peso molecular del ADN. A su vez, una mezcla de ADN amplificado de diferentes bacterias (*Pasteurella multocida*, *Enterococcus faecalis* y *Clostridium perfringens*) y cortado con la enzima *RsaI* también se utilizó como control de peso molecular. Las bandas del ADN fueron visualizadas con ayuda de un transiluminador, el Chemigenious Image System (SynGene, Cambridge, UK) y utilizando el software GeneSnap (SynGene Analysis Cambridge, UK. Versión 3.02.00). El tamaño de cada fragmento de restricción y la intensidad de las bandas fue calculado mediante el software Gene Tools Versión 3.02.00 (SynGene Analysis Cambridge, UK). Para reducir las variaciones subjetivas durante la observación de los geles, se descartaron los picos con una intensidad inferior a 60 unidades. El ruido de fondo fue eliminado utilizando el método del rolling-disk con un radio de 30. Finalmente, se obtuvo un total de 4 perfiles de bandas por cada muestra, correspondientes a los cortes con los 4 enzimas de restricción, anteriormente mencionados.

3.2.4.3. Análisis de los fragmentos de restricción

A partir del análisis de los fragmentos de restricción se calculó la diversidad bacteriana y el grado de similitud.

Para el cálculo de la **diversidad bacteriana** se utilizaron dos parámetros: el número total de bandas y el índice de Shannon-Weaver H' (Shannon y Weaver, 1963). El número total de bandas fue calculado, para todas las muestras recogidas en el estudio, como el sumatorio total de las bandas obtenidas en las cuatro reacciones enzimáticas. El índice de Shannon-Weaver (H') fue calculado a partir de las muestras de digesta del yeyuno distal y del colon proximal mediante la función: $H' = -\sum P_i \log P_i$, donde P_i es la probabilidad de encontrar una determinada banda en un carril. Así, P_i fue calculado mediante la fórmula $P_i = n_i/n_t$ donde n_i es la altura de un pico determinado y n_t es el sumatorio de todos los picos de una curva densitométrica. El valor final del índice de Shannon-Weaver fue obtenido como promedio del índice de Shannon-Weaver obtenido de cada animal.

Para comparar la **similitud** de la composición de las bacterias entre las diferentes dietas experimentales y entre los diferentes tramos intestinales, se construyeron diferentes dendrogramas mediante el cálculo de la distancia de Manhattan (DM) (Kaufmann y Rousseeuw, 1990):

$$DM(CarrilA, CarrilB) = 100 - \frac{\sum_{ai}^{af} \sum_{eri}^{erf} |Altura.Pico.N(an.ern) - Altura.Pico.M(am.erm)|}{(af - ai) * (erf - eri)}$$

ai: altura inicial de bandas en un carril.

af: altura final de bandas en un carril.

an.ern: altura de la banda n para un enzima de restricción n.

am.erm: altura de una banda m para un enzima de restricción m.

eri: enzima de restricción inicial.

erf: enzima de restricción final.

Los valores de este coeficiente van de 0 a 100. Para su cálculo se tuvieron en cuenta tanto la presencia como la ausencia de una banda y su intensidad (altura de los picos de las curvas densitométricas). A partir de la matriz de distancias se crearon diferentes dendrogramas mediante el algoritmo de neighbour-joining.

3.2.5. Análisis estadístico

El efecto de la dieta y del tramo gastrointestinal sobre el número de bandas fue examinado mediante pruebas no paramétricas (Kruskall-Wallis), utilizando el programa estadístico SAS (SAS Institute, INC. 8.2, Cary, NC). Los resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$) fueron posteriormente analizados mediante el test de Wilcoxon (comparaciones 2x2) aplicando la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. El efecto dieta sobre el índice de Shannon-Weaver y los parámetros productivos fueron analizado mediante el procedimiento GLM (general linear model) del SAS. Para todos los análisis, la significación estadística se determinó para valores de $p < 0,05$.

3.3. Resultados

3.3.1. Parámetros clínicos y productivos

No se observó ningún episodio de diarrea ni ningún otro signo clínico durante todo el periodo experimental. Cabe remarcar, que tampoco hubo diferencias significativas en los parámetros productivos estudiados. Sin embargo, los animales alimentados con la dieta AC o la dieta AB tendían a tener ($p=0,08$) un mayor peso promedio el día del sacrificio que el grupo alimentado con la dieta CT (AC=11,2±1,4, AB=11,0±1,1, XT=10,5±1,4 y CT=9,9±0,85 kg). Además, los animales que recibieron dietas con alguno de los aditivos tendieron a tener ($p=0,069$) una mayor ganancia media diaria de peso (ADG) que el grupo control (CT=124,7±19,1 g, AB=177,4±57,5 g, AC=177,6±33,1 g y XT=165,9±37,4 g).

3.3.2. Diversidad bacteriana

3.3.2.1. Número de bandas obtenidas mediante PCR-RFLP.

Como ya se ha comentado, el número de bandas para cada tramo gastrointestinal y cada animal se obtuvo como el sumatorio total de las bandas obtenidas en las cuatro reacciones enzimáticas (Figura 3.1.).

El valor promedio del número de bandas varió desde 18 a 46 bandas por grupo (ver Figura 3.2.). Para todas las dietas, el número de bandas fue mayor en los tramos intestinales distales (con valores entre 32,5 y 46,9) que en los tramos intestinales proximales (de 18,6 a 32,62) ($p<0,05$). Este efecto fue más pronunciado en las dietas AC y AB.

Figura 3.1. Comparación de los patrones de bandas obtenidos mediante la PCR – RFLP y la utilización del enzima *Alu I* en el colon proximal de los 4 animales sacrificados a día 19. Los cerdos fueron alimentados con una dieta control (CT) o con la misma dieta con el 0,04 % de avilamicina (AB), o el 0,3 % del ácido butírico (AC) o el 0,03 % del extracto de plantas. Los diferentes números en la parte superior muestran la referencia del animal. Los números en la parte inferior indican el número de bandas por carril y su promedio.

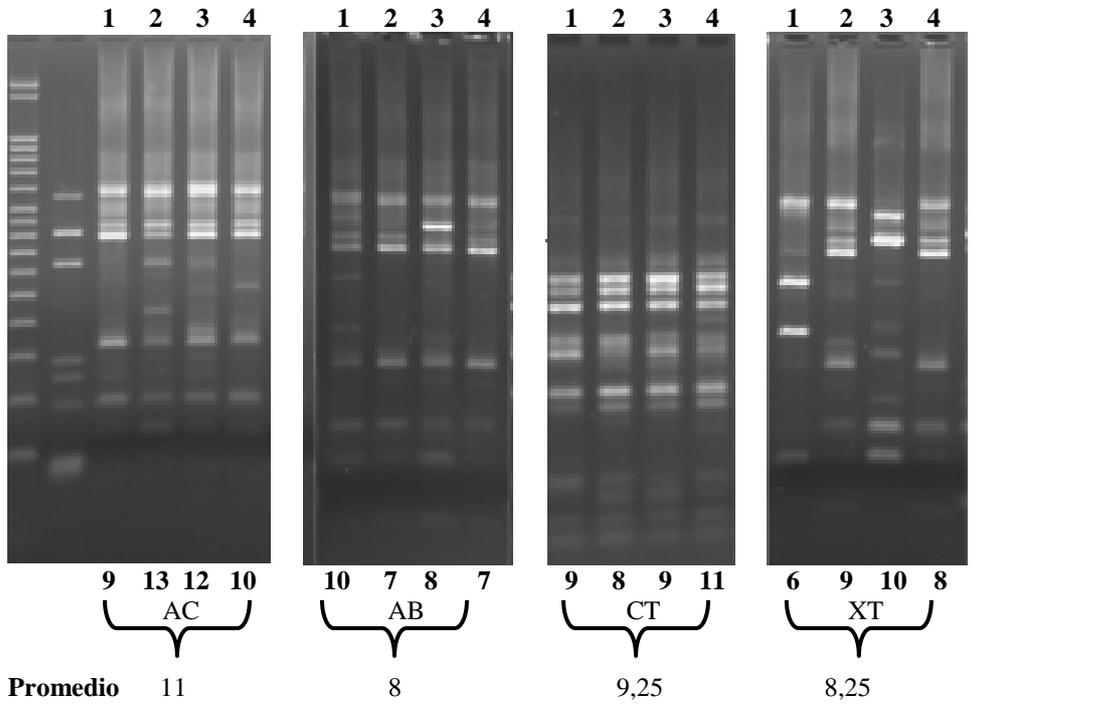
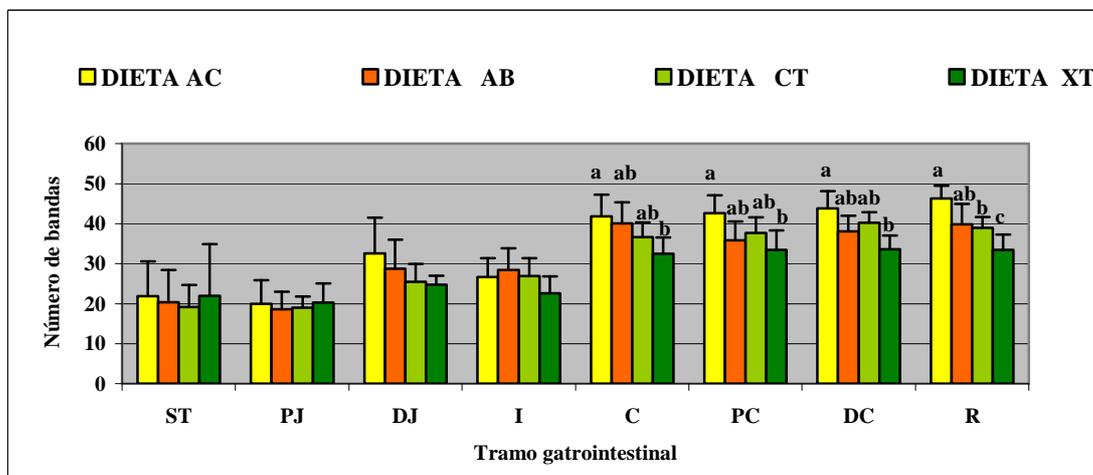


Figura 3.2. Diversidad microbiana en los diferentes tramos intestinales del tracto digestivo. Los cerdos fueron alimentados con una dieta control (CT) o con la misma dieta con el 0,04 % de avilamicina (AB), o el 0,3 % del ácido butírico (AC) o el 0,03 % del extracto de plantas. Las muestras fueron obtenidas a partir de contenido del estómago (ST), del yeyuno proximal (PJ) del yeyuno distal (DJ) del íleon (I), del colon proximal (PC), del colon distal (DC) y del recto(R). Las barras de error representan la desviación estándar. Letras diferentes (a, b, c) implican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tramo ($p < 0,05$).



En algunos tramos del tracto gastrointestinal, concretamente en yeyuno distal y en ciego, se observaron diferencias significativas entre los cuatro animales sacrificados a los 19 días y los cuatro animales sacrificados a los 21 días, pertenecientes a una misma dieta. Este “efecto sacrificio” se observó en estos tramos concretos, en todas las dietas. A modo de ejemplo, en el yeyuno distal, los animales del grupo AC, sacrificados el día 19 presentaban un promedio de 38 bandas, mientras que los sacrificados a los 21 días presentaban un promedio de 27 bandas ($p= 0,0029$). En el ciego, los cuatro animales del grupo AC sacrificados el día 19 presentaban un promedio de 45 bandas, mientras que los sacrificados a los 21 días presentaban un promedio de 38 bandas ($p= 0,02$).

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre dietas a nivel de los tramos intestinales más distales (C, PC, DC y R). Las diferencias más significativas fueron observadas entre las dietas AC y XT. Globalmente, en todos los tramos intestinales distales, los animales alimentados con la dieta AC tuvieron un mayor número de bandas que los animales alimentados con la dieta XT. Únicamente a nivel del recto, los animales que recibieron la dieta AC tuvieron un mayor número de bandas que la dieta CT. También en este mismo tramo los animales alimentados con la dieta XT tuvieron un menor número de bandas que la dieta CT.

3.3.2.2. Índice de Shannon – Weaver en el yeyuno distal y colon proximal

En el yeyuno distal, mediante el cálculo del índice de Shannon-Weaver, no se detectaron diferencias significativas entre las diferentes dietas experimentales (Tabla 3.2.). Sin embargo, se observó una disminución del grado de diversidad bacteriana en función del día de sacrificio (primer día = 1,32, segundo día = 1,20).

En cambio, en el colon proximal se observó que la diversidad microbiana dependía de la dieta administrada (Tabla 3.2.). Los animales alimentados con la dieta AC tuvieron una mayor diversidad bacteriana con respecto al resto de dietas experimentales. Por el contrario, los animales alimentados con la dieta XT tuvieron una menor diversidad bacteriana con respecto al grupo AC y CT. No se observaron diferencias significativas entre la diversidad bacteriana de los animales alimentados con la dieta AB y los animales alimentados con la dieta CT.

Comparando el grado de diversidad entre el yeyuno distal y el colon proximal se observaron diferencias significativas entre estos dos tramos (1,26 y 1,41 respectivamente $p = 0,0001$).

Tabla 3.2. Efecto de la dieta sobre el grado de diversidad microbiana (índice de Shannon – Weaver) en la digesta del yeyuno distal y del colon proximal. Letras diferentes (a, b, c) implican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tramo ($p < 0,05$).

Índice Shannon	Dietas				*EEM	p-valor dieta	p- valor sacrificio	p-valor dieta*sacrificio
	AC	AB	CT	XT				
Yeyuno distal	1,32	1,26	1,23	1,22	0,028	0,07	0,0004	0,7649
Colon proximal	1,48 ^a	1,39 ^{bc}	1,42 ^b	1,37 ^c	0,0188	0,0018	0,098	0,34

*EEM = Error estandar de la media

3.3.3. Similitud bacteriana

Como ya se ha comentado, el grado de similitud de las poblaciones bacterianas, entre las diferentes dietas y los diferentes tramos estudiados, se evaluó a través del cálculo de la DM y la posterior elaboración de dendrogramas (Figuras 3.3. a 3.8.).

El dendrograma generado a partir de los patrones de bandas de los diferentes tramos del tracto digestivo de los cerdos que recibieron la dieta control (CT) se muestra en la Figura 3.3.. Se pudieron observar mayoritariamente 2 *clusters* en función del día de sacrificio. Así, la gran mayoría de los animales que se sacrificaron el día 19 (numeración del 1 al 3) se agruparon en una rama del dendrograma, mientras que los animales que se sacrificaron el día 21 (con una numeración del 5 al 8) se agruparon en otro *cluster*. Este efecto no se observó en el estómago. Este efecto también se observó en los animales alimentados con la dieta AC (Figura 3.4.), sin embargo no se observó tan claramente en los animales alimentados con la dieta AB y XT (Figura 3.5. y 3.6. respectivamente).

Analizando en más detalle las diferentes ramas del árbol de los animales alimentados con la dieta CT, se pudieron observar agrupaciones en función del tramo intestinal. Dentro del grupo de animales sacrificados a día 19, se observaron 2 subgrupos. Un

subgrupo formado por tramos distales del tracto digestivo (C, PC, DC y R) y otro subgrupo formado por tramos proximales (PJ, DJ e I). En cuanto a los animales sacrificados a día 21, se observaron tres agrupaciones diferentes. Un subgrupo formado por el ST, el PJ y el DJ, otro subgrupo formado por los diferentes segmentos del intestino grueso (C, PC, DC y R) y un tercer subgrupo bien definido formado por el I. Esta separación entre los tramos anteriores y los tramos posteriores se observó también en el resto de dietas experimentales (Figuras 3.3., 3.4., 3.5. y 3.6.).

Para analizar el efecto de las dietas en un determinado tramo intestinal, se generaron diferentes dendrogramas. En los dendrogramas generados a partir de las muestras de ST, PJ, DJ, I, C, DC y R no se observó ninguna agrupación clara entre las dietas estudiadas. Únicamente, a nivel del colon proximal, se observó que los cerdos alimentados con la dieta AC formaban un grupo bien definido (Figura 3.7.).

Dado que se había detectado ya previamente un “efecto día de sacrificio” en cuanto al grado de diversidad microbiana en el yeyuno distal y en el ciego, se decidió generar los dendrogramas de estos dos tramos con los cuatro animales sacrificados el día 19 y los cuatro sacrificados el día 21. Sorprendentemente, en el yeyuno distal, los animales sacrificados el primer día presentaron una agrupación en función de la dieta mientras que los animales sacrificados el segundo día no presentaban ninguna agrupación concreta (Figura 3.8.).

Figura 3.3. Dendrograma ilustrando el porcentaje de similitud del patrón de bandas obtenido mediante PCR - RFLP en los diferentes tramos del tracto gastrointestinal de los cerdos alimentados con la dieta CT. (La clave roja agrupa los tramos anteriores, la clave verde agrupa los tramos posteriores, la clave amarilla agrupa el íleon, el cuadro naranja agrupa los animales sacrificados el día 21 y el cuadro azul agrupa los animales sacrificados el día 19). La identificación de los cerdos esta indicada en cada muestra

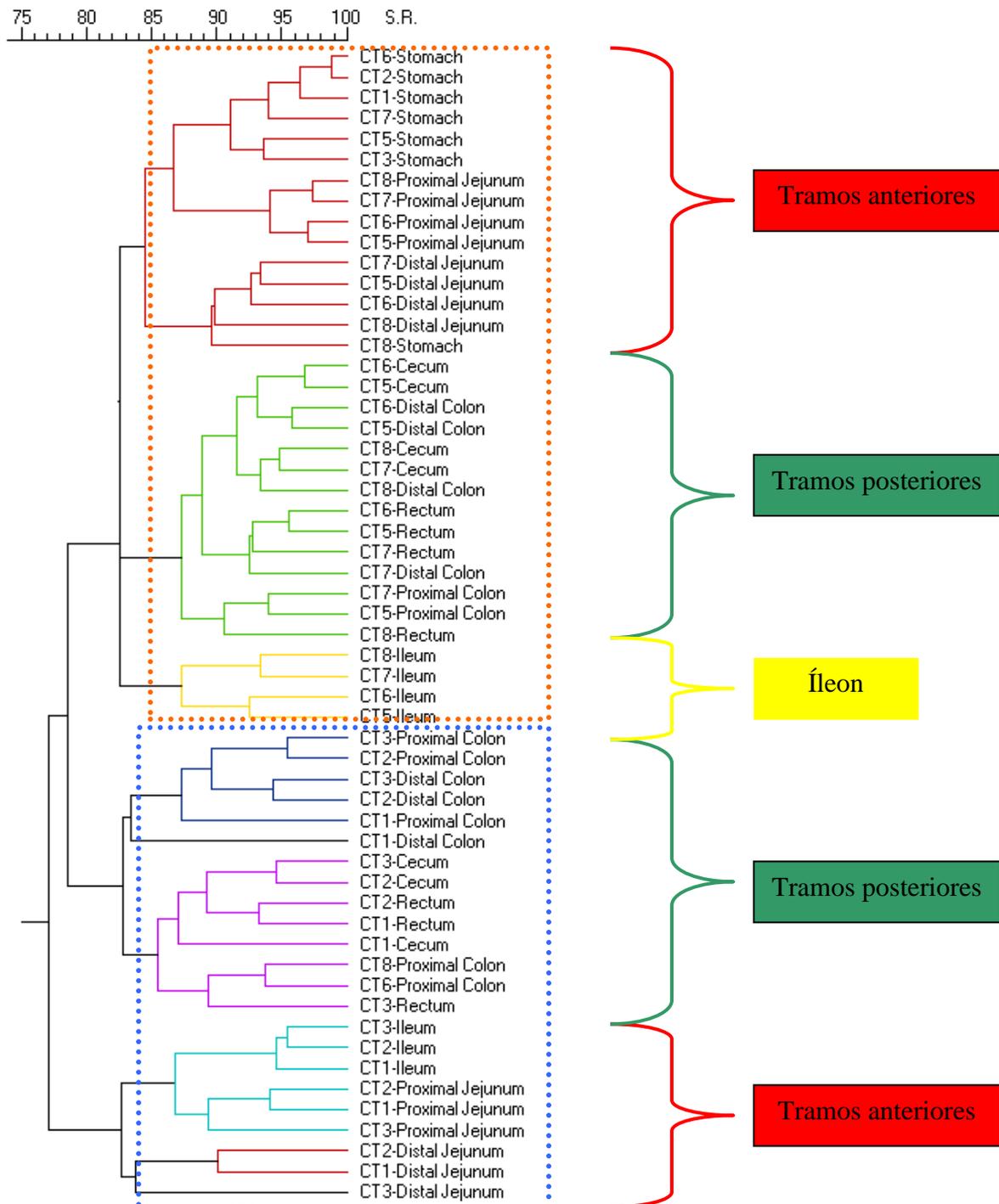


Figura 3.4. Dendrograma ilustrando el porcentaje de similitud del patrón de bandas obtenido mediante PCR - RFLP en los diferentes tramos del tracto gastrointestinal en los animales alimentados con la dieta AC. (La clave roja agrupa los tramos anteriores, la clave verde agrupa los tramos posteriores, el cuadro naranja agrupa los animales sacrificados el día 21 y el cuadro azul agrupa los animales sacrificados el día 19). La identificación de los cerdos esta indicada en cada muestra.

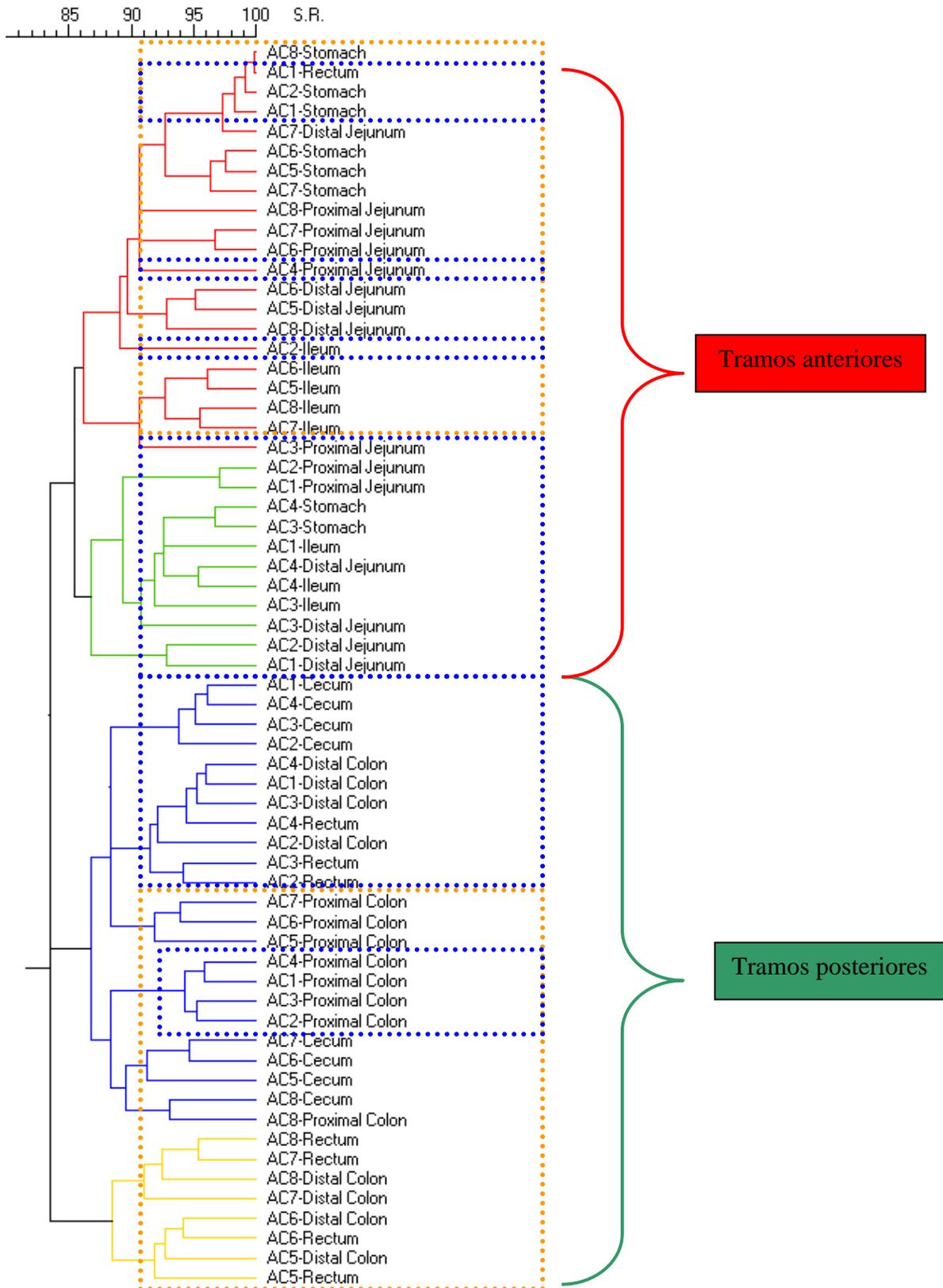


Figura 3.5. Dendrograma ilustrando el porcentaje de similitud del patrón de bandas obtenido mediante PCR - RFLP en los diferentes tramos del tracto gastrointestinal en los animales alimentados con la dieta AB. (La clave roja agrupa los tramos anteriores, la clave verde agrupa los tramos posteriores, el cuadro naranja agrupa los animales sacrificados el día 21 y el cuadro azul agrupa los animales sacrificados el día 19). La identificación de los cerdos esta indicada en cada muestra.

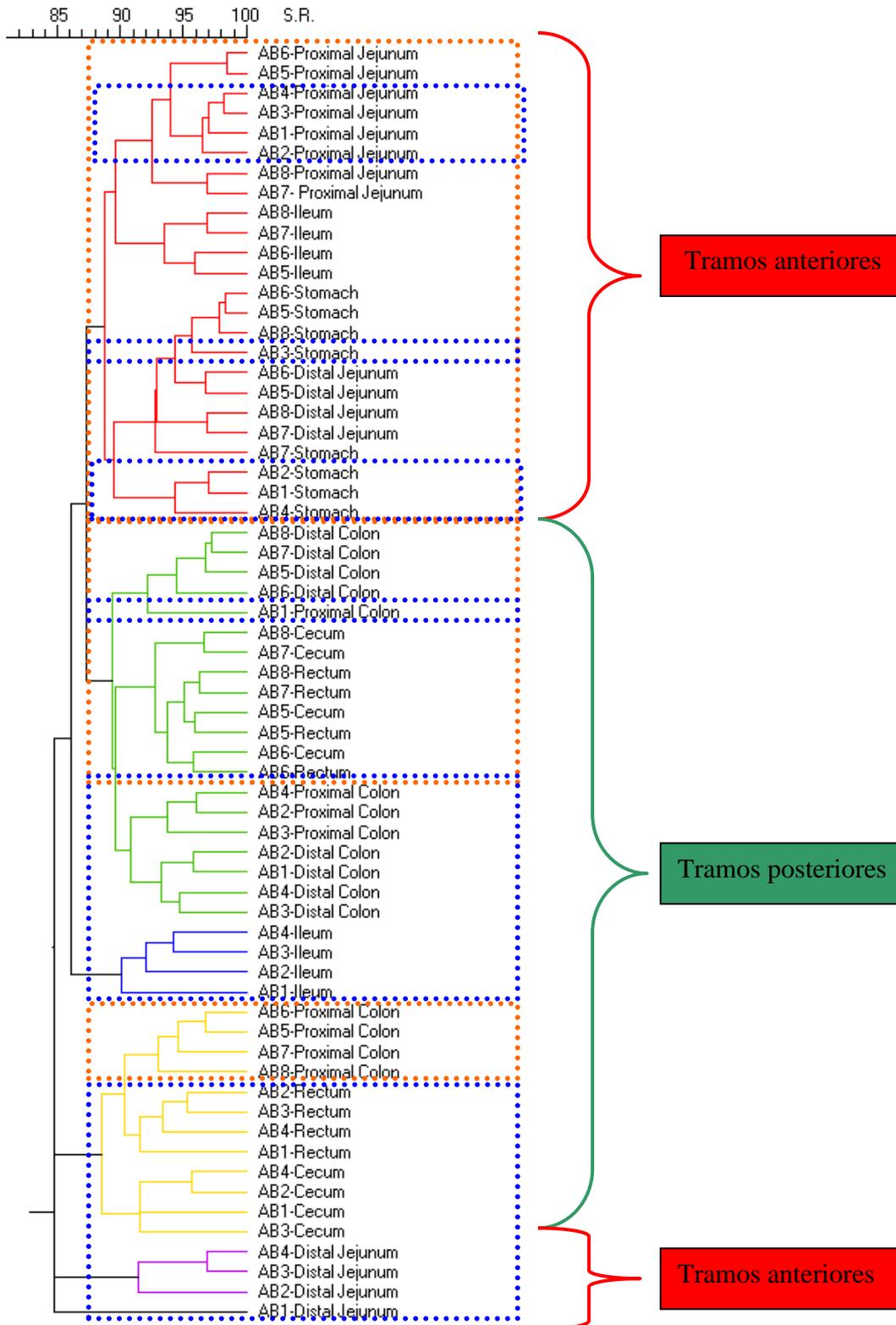


Figura 3.6. Dendrograma ilustrando el porcentaje de similitud del patrón de bandas obtenido mediante PCR-RFLP en los diferentes tramos del tracto gastrointestinal en los animales alimentados con la dieta XT. (La clave roja agrupa los tramos anteriores, la clave verde agrupa los tramos posteriores, el cuadro naranja agrupa los animales sacrificados el día 21 y el cuadro azul agrupa los animales sacrificados el día 19). La identificación de los cerdos esta indicada en cada muestra.

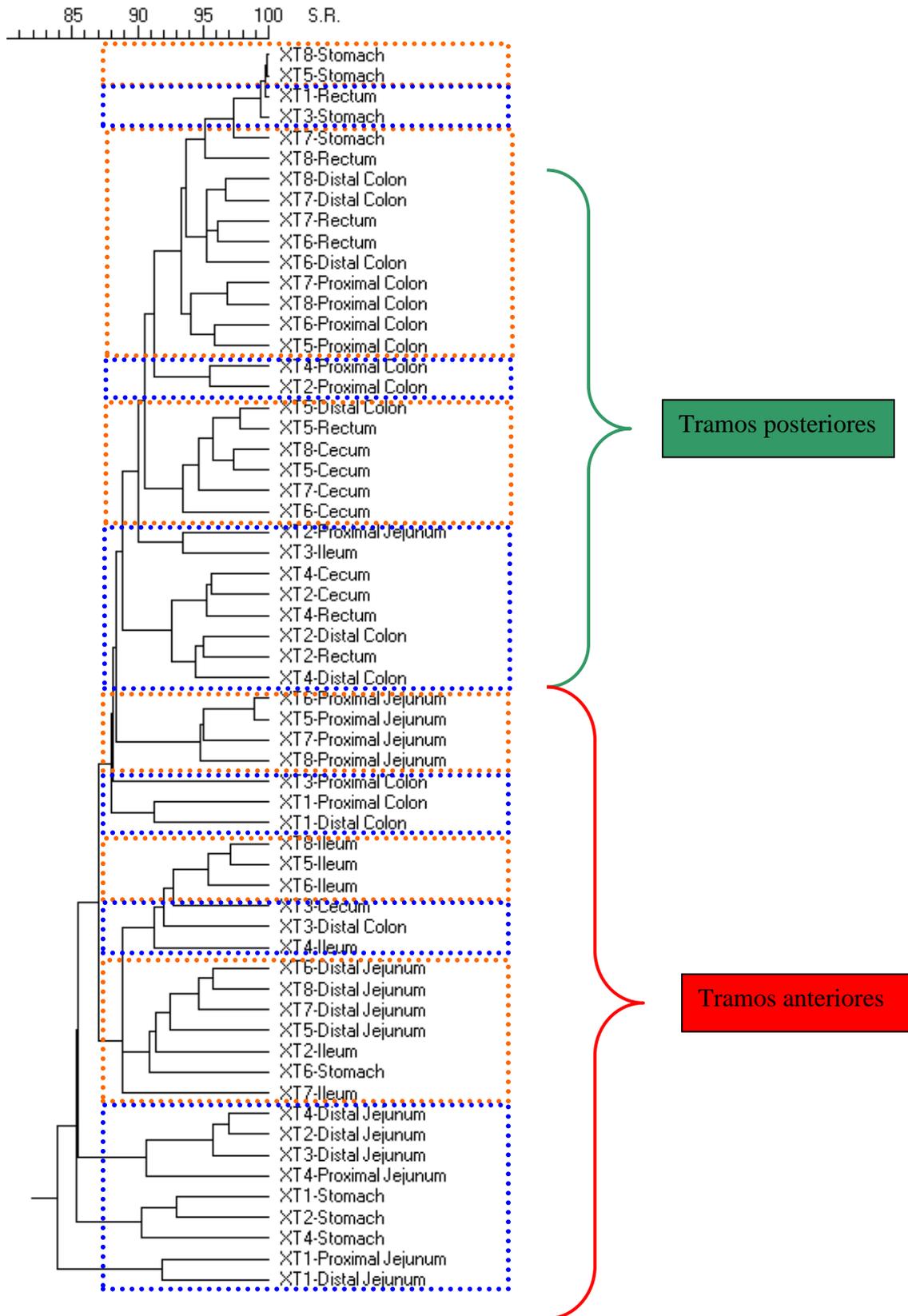


Figura 3.7. Cambios ecológicos en las poblaciones microbianas del colon proximal. El dendrograma ilustra el porcentaje de similitud del patrón de bandas cuando se comparan las cuatro dietas experimentales en los ocho animales por grupo.

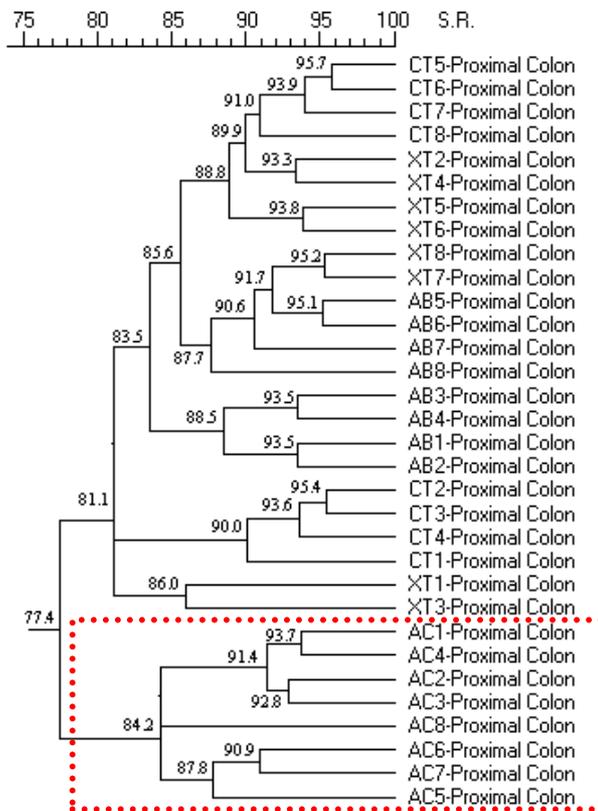
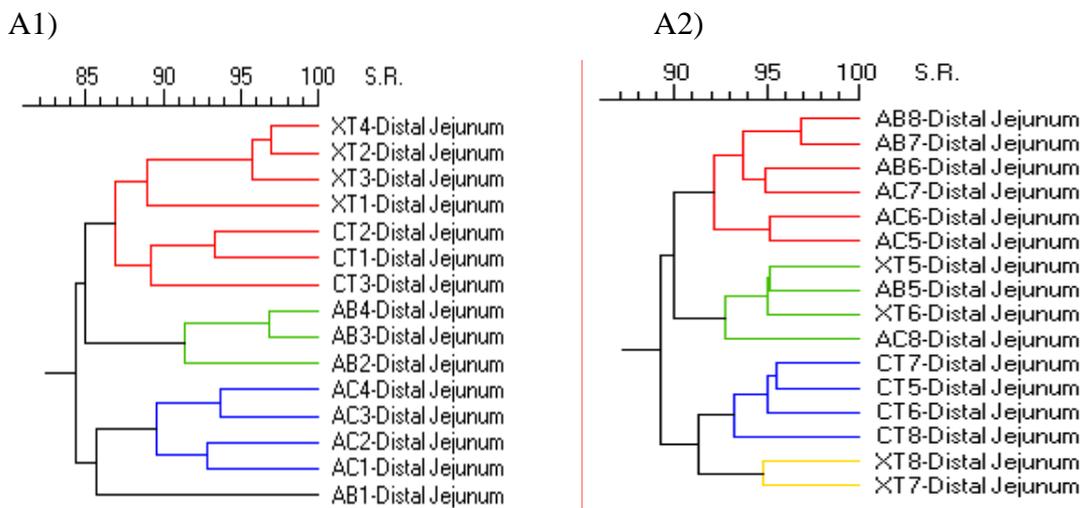


Figura 3.8. Cambios ecológicos en las poblaciones microbianas del yeyuno distal. Los dendrogramas ilustran el porcentaje de similitud del patrón de bandas cuando se comparan las cuatro dietas experimentales en los cuatro animales sacrificados a día 19 (A1) y en los cuatro animales sacrificados a día 21 (A2).



3.4. Discusión

La población microbiana del tracto gastrointestinal de los cerdos ha sido tradicionalmente estudiada mediante técnicas de cultivo bacteriano (Robinson *et al.*, 1981; Robinson *et al.*, 1984). Sin embargo, en estos últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas moleculares especialmente útiles para el estudio de bacterias, independientemente de si son cultivables o no (Leser *et al.*, 2002; Pryde *et al.*, 1999). La utilización de estas nuevas técnicas ha permitido una mejor caracterización de la composición de la microbiota intestinal.

La utilización de la técnica de PCR-RFLP en el presente trabajo presenta como ventaja principal el hecho de que con ella podemos obtener una visión más global de la composición de un ecosistema bacteriano complejo, como es el tracto gastrointestinal de los animales. Además nos permite monitorizar cambios generales que se pueden dar en una población bacteriana debido a un cambio de dieta, al tiempo, etc. Utilizando esta técnica estamos analizando tanto bacterias cultivables como bacterias no cultivables o bacterias no caracterizadas. Se estima que la comunidad microbiana del colon esta compuesta por unas 400-500 especies bacterianas diferentes (Ewing y Cole, 1994). A pesar de que mediante la PCR-RFLP se obtiene una visión más global del ecosistema del tracto digestivo, con el número de bandas obtenido (máximo número de bandas fue de 46 bandas) se puede inferir que con esta técnica aún se podría infravalorar la diversidad bacteriana real. Este hecho puede ser debido a que durante la PCR se dé una amplificación preferencial de ciertas especies bacterianas, causando una insuficiente amplificación del ADN de las bacterias minoritarias. Sin embargo, esta información siempre es mayor que la que se puede obtener a partir del cultivo de algunos grupos bacterianos.

Además, la técnica del PCR-RFLP es altamente reproducible y fácilmente aplicable en muchos laboratorios, sin necesidad de una inversión muy elevada. A diferencia de los cultivos bacterianos, mediante la utilización de la PCR-RFLP, podemos analizar un gran volumen de muestras, ya que no requiere que se procesen de forma inmediata.

Sin embargo, la utilización de la PCR-RFLP también ha presentado algunas desventajas importantes como la variabilidad que se puede obtener en función del método de extracción de ADN, de la PCR realizada o de los enzimas de restricción utilizados, lo

que no permite una comparación fácil de los resultados obtenidos por diferentes autores. Otra de sus limitaciones es que no permite relacionar directamente un fragmento de restricción con una especie bacteriana. Para ello, es necesario recurrir a la secuenciación del fragmento o bien realizar comparaciones teóricas entre los fragmentos de restricción obtenidos de las muestras analizadas y los fragmentos de restricción teóricamente calculados a partir de simulaciones informáticas de las digestiones enzimáticas de diferentes secuencias bacterianas. Mediante estas simulaciones es posible obtener de forma tentativa una relación entre un fragmento de restricción y unas especies bacterianas concretas. Sin embargo este tipo de comparaciones pueden ser ambiguas debido al hecho que cada fragmento de restricción originado puede corresponder a una o a múltiples especies bacterianas que comparten fragmentos similares para un determinado enzima de restricción.

En este trabajo, mediante la utilización de la PCR-RFLP, fue posible evaluar la diversidad y la similitud u homogeneidad de las poblaciones microbianas gastrointestinales, tanto en relación con los diferentes tramos del tracto digestivo como con las diferentes dietas experimentales.

Analizando los resultados, se puede observar que la diversidad microbiana incrementa significativamente en los tramos intestinales más distales. Varios factores como el pH (entre 5-8), el lento tránsito intestinal y/o el bajo potencial de oxidación-reducción están asociados a una mayor supervivencia de las bacterias en el intestino grueso (Stewart, 1997). Sin embargo, además de una mayor supervivencia, las condiciones que se dan en los tramos distales del tracto digestivo, favorecen una mayor diversidad bacteriana. Estos resultados presentan una buena concordancia con los resultados publicados por Konstantinov y colaboradores (2004) o por Wang y colaboradores (2005). Contrariamente, las condiciones que se dan en los tramos más proximales del tracto digestivo, hacen que su diversidad microbiana sea menor y que estén mayoritariamente colonizados por bacterias del ácido láctico. Además, cuando los patrones de bandas son analizados mediante la creación de dendrogramas, se observa que, en general, los tramos proximales (estómago, yeyuno proximal y yeyuno distal) y los tramos distales (ciego, colon proximal, colon distal y recto) se agrupan próximamente entre ellos. En el caso de los animales sacrificados a los 21 días, se observó un grupo bien definido a partir de las muestras de contenido ileal y separado tanto de los tramos intestinales

proximales como de los tramos intestinales distales. Este resultado puede estar relacionado con el hecho de que el íleon es un punto intermedio entre los tramos intestinales proximales y los tramos intestinales distales. En este mismo sentido, Simpson y colaboradores (1999) mediante la utilización de la PCR-DGGE demostraron que era posible encontrar diferencias en los patrones de bandas de los diferentes compartimentos del tracto digestivo siendo la similitud mayor dentro de un mismo compartimiento y entre los compartimentos más cercanos. A partir de estos resultados, se podría sugerir que para futuros estudios de diversidad microbiana del tracto digestivo de los cerdos, sería suficiente el análisis del yeyuno/íleon, como muestra representativa del tracto digestivo proximal, y del ciego o el colon, como muestra representativa del tracto digestivo más distal.

La diversidad microbiana se vio alterada por el día de sacrificio, en algunos tramos del tracto digestivo, concretamente en yeyuno distal y ciego. También se observó el “efecto sacrificio” al estudiar el grado de similitud en algunos de los dendrogramas (animales alimentados con la dieta CT y AC). Este efecto podría estar relacionado con el estrés que se pueda generar al sacrificar la mitad del grupo experimental y modificar en consecuencia la jerarquía del grupo. Se ha demostrado que tras un estrés agudo, las poblaciones bacterianas del tracto digestivo pueden alterarse rápidamente. Williams y colaboradores (2008) observaron una disminución de la homogeneidad de los patrones de bandas tras realizar un transporte de cerdos. Así pues, este efecto sacrificio y en definitiva cualquier factor que pueda alterar el comportamiento o estresar a los animales, podría ser importante y debería tenerse en cuenta en el diseño de experimentos en los que se analice el efecto de diferentes factores sobre la composición de la microbiota intestinal.

Además del análisis de la microbiota a lo largo del tracto gastrointestinal, en este trabajo también se estudió el efecto de la incorporación de la avilamicina, del butirato de sodio y de una mezcla de diferentes extractos de plantas sobre la microbiota intestinal. En este caso, las diferencias más relevantes se encuentran en los tramos intestinales posteriores y especialmente en los animales alimentados con la dieta enriquecida con butirato de sodio y los animales alimentados con extractos de plantas. Así, los animales alimentados con la dieta AC presentan una mayor diversidad microbiana, mientras que

los animales alimentados con la dieta con extractos de plantas presentan una menor diversidad bacteriana.

A pesar que está demostrado que los acidificantes ejercen una acción antimicrobiana, actualmente existen pocos estudios donde se analice el efecto global de los ácidos sobre las poblaciones microbianas a lo largo del tracto gastrointestinal. Torrallardona y colaboradores (2007), utilizando una dieta con un 0,5 % de ácido benzoico, detectaron una mayor diversidad microbiana en el íleon. Contrariamente, Canibe y colaboradores (2005) utilizando una dieta con ácido fórmico detectaron mediante T-RFLP una reducción de la diversidad microbiana, tanto en los tramos intestinal proximales como en el colon. Probablemente, factores como el tipo de ácido (un solo ácido o una mezcla), la dosis utilizada, la tolerancia y su modo de acción pueden explicar estos efectos contradictorios.

A priori se espera que la acción de los ácidos orgánicos sea mayor en los tramos proximales de tracto digestivo (estómago e intestino delgado). Sin embargo, en nuestro estudio, el efecto del butirato de sodio se observó sobre el ecosistema bacteriano de los tramos intestinales más distales. Este incremento de la diversidad microbiana detectado en los animales alimentados con la dieta AC, podría estar relacionado con algún efecto directo (producido por algún metabolito derivado del mismo butirato de sodio) o indirecto (reducción de alguna especie bacteriana que, a su vez, controle la concentración de otras especies bacterianas) del butirato de sodio sobre las poblaciones bacterianas del tracto digestivo proximal. Este efecto podría determinar alguna influencia sobre la microbiota de los segmentos más distales. Así, van Winsen y colaboradores (2001), analizando el efecto del alimento fermentado hipotizaron que el número de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* en el estómago determinaba el nivel de estas bacterias en las heces. Los autores atribuyeron este resultado a un efecto de la microbiota de los tramos anteriores sobre los posteriores. Analizando los resultados obtenidos por Manzanilla y colaboradores (2006) en un trabajo realizado en paralelo y utilizando las mismas muestras que las que se utilizan en esta tesis, los autores detectaron un incremento en las concentraciones de ácido butírico en el estómago debido a su inclusión en la dieta (CT = 4,87, AB = 5,11, XT = 2,98 vs. AC = 15,54; EEM = 0,970, *p* valor = 0,0001). Sin embargo, la concentración de este ácido no presentó diferencias significativas entre dietas experimentales en el resto de tramos del

tracto digestivo. Este hecho podría reforzar la hipótesis de que el efecto del butirato de sodio sobre la microbiota del tracto digestivo posterior pudiera ser un efecto indirecto.

La disminución de la diversidad microbiana en animales alimentados con la dieta enriquecida con extractos de plantas ha sido descrita previamente en algunos estudios (Namkung *et al.*, 2003). Esta reducción de la diversidad microbiana puede ser debida al efecto antimicrobiano de los extractos de plantas, inhibiendo algunos grupos bacterianos y promocionando otros grupos bacterianos específicos. En este caso, en un estudio en paralelo, utilizando las mismas muestras, Castillo y colaboradores (2006b) detectaron mediante PCR cuantitativa un incremento significativo del número de lactobacilli en el ciego en los animales alimentados con la dieta enriquecida a base de extractos de plantas. Sin embargo, en este mismo estudio los autores no detectaron diferencias significativas en la cantidad de bacterias totales, tanto en los animales alimentados con la dieta enriquecida con el butirato de sodio, como con la dieta enriquecida con el extracto de plantas. Estos resultados nos indican que estos aditivos producen cambios cualitativos sobre las poblaciones bacterianas del tracto gastrointestinal sin afectar a la cantidad total de bacterias. Este hecho ha sido descrito ya en otros estudios (Canibe *et al.*, 2005).

Nuestros resultados muestran que los animales alimentados con la dieta control y los animales alimentados con la dieta enriquecida con avilamicina tienen una riqueza microbiana similar. Este resultado se observa a lo largo de todo el tracto digestivo. Collier y colaboradores (2003) utilizando la PCR-DGGE para el estudio de la composición bacteriana en el íleon en cerdos tratados con tilosina durante 21 días, observaron un número similar de bandas entre los animales alimentados con la dieta control y los animales que recibían el pienso suplementado con el antibiótico. Este resultado lo atribuyeron a una adaptación de la microbiota a la administración del antibiótico, pudiendo indicar una sustitución de las bacterias sensibles a los antibióticos por bacterias resistentes a los mismos.

CAPÍTULO 4

**RESPUESTA ADAPTATIVA DE LA MICROBIOTA DEL TRACTO DIGESTIVO
FRENTE A DIFERENTES FUENTES DE FIBRA EN CERDOS DE ENGORDE**

4.1. Introducción

En nutrición animal se utilizan ingredientes con gran cantidad de fibra dietética en las dietas. La fibra, ha sido definida como la parte comestible de las plantas que no es digerida por las secreciones endógenas y no es absorbida en el tracto digestivo anterior (Trowell *et al.*, 1976). Sin embargo, la fibra puede ser parcial o totalmente fermentada por la microbiota del tracto digestivo. El término fibra dietética esta compuesto por un grupo muy diverso de componentes, incluyendo los polisacáridos no amiloides (PNAs) solubles e insolubles, los oligosacáridos no digestibles, el almidón resistente y la lignina (Salyers, 1979).

La administración de ingredientes fibrosos en la dieta puede reducir la productividad de los animales (Kass *et al.*, 1980). Este hecho esta relacionado con la menor digestibilidad de estos ingredientes. Sin embargo, actualmente se acepta que la inclusión de ingredientes fibrosos en la dieta promueve algunos efectos beneficiosos, como la reducción del riesgo de constipación (Tabeling *et al.*, 2003) y la mejora del llenado intestinal mejorando así la saciedad (Meunier-Salaun *et al.*, 2001). También se ha descrito que la fibra puede modificar las características fisicoquímicas de la digesta (Anguita *et al.*, 2007; Mikkelsen *et al.*, 2004), la morfología y la integridad intestinal, (Brunsgaard, 1998; McCullogh *et al.*, 1998), la funcionalidad (Correa-Matos *et al.*, 2003; Tappenden *et al.*, 1997), y también la inmunidad intestinal (Cavaglieri *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 1997). Además, la utilización de ingredientes fibrosos puede representar una estrategia para modular las poblaciones bacterianas a lo largo del tracto digestivo. Así, Varel y Yen (1984) demostraron un incremento del número de las especies bacterianas con capacidad celulolítica tras la administración de ingredientes fibrosos. Asimismo, en un estudio realizado por Gibson y Wang (1994) se observó un incremento del número de bacterias del ácido láctico al administrar fibras altamente fermentables en la dieta.

Además de modificar la cantidad de determinadas especies bacterianas, se ha observado que mediante la administración de diferentes ingredientes fibrosos, también se puede modificar la carga bacteriana total, la diversidad microbiana y su actividad. En un estudio realizado por Jensen y Jorgensen (1994), donde se comparaban dos dietas con diferentes niveles de fibra, se demostró que los cerdos alimentados con un alto

porcentaje de fibra presentaban una mayor cantidad de bacterias cultivables a nivel del estómago y una mayor actividad microbiana en el intestino grueso. En cuanto a la diversidad microbiana, parámetro propuesto como indicador de la estabilidad intestinal (Atlas, 1984; Zoetendal *et al.*, 2004), Konstantinov y colaboradores (2003, 2004) demostraron que los lechones alimentados con carbohidratos altamente fermentables (pulpa de remolacha, fructoligosacáridos, lactulosa o inulina), poseían una mayor diversidad microbiana y una estabilización más rápida de las poblaciones bacterianas intestinales.

A pesar de estos efectos beneficiosos que se atribuyen a la fibra en relación con la diversidad y estabilidad bacteriana, los resultados, cuando se intenta relacionar la ocurrencia de las enfermedades entéricas con la utilización de fibra en la dieta, son contradictorios. En el caso de la infección intestinal por *Brachyspira hyodysenteriae*, existen trabajos donde o bien no se observa una relación clara (Lindecrona *et al.*, 2003) o bien se demuestra que la utilización de dietas con altos niveles de fibra fermentable mejoran los problemas de disentería porcina (Baumann y Bilkei, 2002). Por el contrario, otros estudios demuestran que las dietas con bajo nivel de fibra previenen la aparición de esta enfermedad (Durmic *et al.*, 1998; Pluske *et al.*, 1996). Probablemente estas discrepancias sean debidas a que el término fibra engloba componentes muy diversos que actúan de forma diferente sobre las poblaciones bacterianas intestinales.

El objetivo principal de este trabajo fue el de estudiar el efecto de diferentes tipos de fibra sobre la microbiota intestinal mediante la utilización de diferentes técnicas moleculares (PCR-RFLP, PCR cuantitativa y FISH). Además, también se estudió la respuesta inmediata de la microbiota del tracto gastrointestinal a un cambio de dieta (a los 7 días) así como la adaptación de la misma a lo largo del tiempo (a los 42 días).

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Animales, alojamiento y manejo

La prueba fue realizada en la unidad experimental de la *Universitat Autònoma de Barcelona* con la aprobación previa de la Comisión de Ética para la Experimentación Animal y Humana de la misma universidad. Todos los procedimientos relacionados con

animales fueron realizados de acuerdo con la normativa europea (Directiva 86/609/CEE).

Se utilizaron un total de 104 cerdos cruzados (Pietrain x [Landrace x Large White]) de seis semanas de edad, machos y hembras mezclados, con un peso inicial de $15 \pm 0,2$ kg. Estos animales fueron obtenidos de una granja comercial (Granja els Cristins, Sant Genís de Palafolls, Girona, España). Los animales fueron transportados a la granja experimental de la universidad, equipada con cuatro salas de ocho corrales cada una (1 m x 1,8 m). Los cerdos fueron distribuidos de acuerdo con su peso inicial, resultando en un total de ocho réplicas por cada tratamiento (tres animales por corral y 2 réplicas por habitación).

4.2.2. Dietas y diseño experimental

Los cerdos fueron alimentados con cuatro dietas experimentales, que diferían en el origen y en el contenido de fibra dietética (Tabla 4.1.), siguiendo los requisitos descritos para los cerdos de engorde del *Nacional Research Council* (1998).

Todas las dietas fueron administradas en forma de harina seca y todos los ingredientes fueron molturados para que pasaran a través de un cedazo de 2,5 mm de diámetro. La dieta considerada control (CT) fue formulada con un 54 % de maíz, un 15 % de cebada, un 28 % de harina de soja 44, un 0,7 % de aceite vegetal y un 3 % de vitaminas minerales y aminoácidos. A partir de esta dieta se obtuvieron las otras tres dietas experimentales (Tabla 4.1.). Estas dietas eran isoenergéticas entre ellas (energía digestible 14,2 MJ/kg) y contenían una cantidad de fibra variable y de diferentes orígenes. El valor energético de las dietas fue balanceado mediante la adición de grasas (aceite vegetal). Para la obtención de una dieta rica en almidón resistente tipo I se sustituyó el maíz de la dieta CT por un maíz molturado a 4 mm de diámetro (Dieta GRO). La dieta enriquecida con polisacáridos no amiloideos solubles fue obtenida mediante la sustitución parcial del maíz de la dieta CT por un 8 % de pulpa de remolacha (Dieta PUL). Finalmente, la dieta enriquecida con polisacáridos no amiloideos insolubles fue obtenida mediante la sustitución parcial del maíz de la dieta CT por un 10 % de salvado de trigo (Dieta SAL). Las dietas fueron administradas *ad libitum* durante 42 días.

Tabla 4.1. Composición y contenido en nutrientes de las diferentes dietas experimentales (en g/kg de materia fresca).

Ingredientes	DIETAS			
	CT	GRO	PUL	SAL
Cebada	150	150	150	150
Concentrado de soja 44	277	277	277	277
Maíz	541	541	453	424
Pulpa de remolacha	-	-	80	-
Salvado de trigo	-	-	-	100
Aceite vegetal	7	7	16	27
L-lisina HCL	1,7	1,7	1,5	1,2
Treonina	0,4	0,4	0,3	0,2
Carbonato calcico	8,1	8,1	6,1	10,8
Fosfato bicálcico	7,6	7,6	8,5	2,7
Cloruro sódico	2,5	2,5	2,2	2,5
Premezcla vitamínica-mineral ¹	4	4	4	4
Cromo (Cr ₂ O ₃)	1,5	1,5	1,5	1,5
Nutrientes				
Materia seca	894,2	897,7	897,7	893,1
Cenizas	42,7	45	43,6	47,6
Energía Bruta (MJ/kg MS)	18,5	18,5	18,6	18,9
Extracto etéreo	34,3	37,7	39,9	50
Proteína bruta	185,3	198,8	187,4	193,4
Almidón	456,7	440,1	357,3	367,4
Fibra Neutra Detergente	141	168	172	186
PNA totales ²	148,0 (29)	150,2 (28)	198,8 (34)	168,1 (26)
Arabinosa	20,2	19	30,7	24,3
Xilosa	24,6	22	23,3	35,9
Galactosa	22,5	22,6	28,3	18,3
Glucosa	45,1	45,4	63,3	50,2
Ácidos urónicos	19,1	18,1	36,5	20,7
Tamaño de partícula (µm) ³	472,36 (2,3)	557,47 (2,2)	528,28 (2,2)	578,77 (2,2)

¹ Aporte por kg de pienso: 5000 UI de vitamina A, 1000 UI de vitamina D3, 15 mg de vitamina E, 1,3 mg de vitamina B1, 3,5 mg de vitamina B2, 1,5 mg de vitamina B6, 0,025 mg de vitamina B12, 10 mg de pantotenato calcio, 15 mg de ácido nicotínico, 15 mg de niacina, 15 mg de biotina, 0,1 mg de ácido fólico, 2 mg de vitamina K3, 80 mg de Hierro, 6 mg de Cobre, 0,75 mg de Cobalto, 60 mg de Zinc, 30 mg de Manganeseo, 0,75 mg de Iodo, 0,10 mg de Selenio, 0,15 mg de Etoxiquín como fungicida.

² PNA, polisacáridos no amiloideos: incluye ramnosa, fructosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa. Entre paréntesis se muestra el porcentaje de PNA solubles.

³ Tamaño de partícula determinado según (Pfof y Headley, 1976). Entre paréntesis, la desviación.

4.2.3. Controles y toma de muestras

La fase experimental duró 42 días, y se dividió en tres periodos experimentales. El primer periodo se inició en el momento en que los animales empezaron a tomar las dietas experimentales y finalizó a los 7 días, el segundo periodo transcurrió de los 7 a los 21 días y el tercer periodo desde los 21 a los 42 días. Al final de cada periodo, se sacrificaron 8 animales por cada dieta en dos días diferentes (días 7 y 9 para el primer periodo, días 21 y 23 para el segundo periodo, y días 42 y 44 para el tercer periodo). Además como control se sacrificaron 8 animales a día 0.

El peso corporal, el consumo de alimento y la eficiencia alimentaria fueron determinados coincidiendo con los días de sacrificio. Tres días antes del sacrificio, se fijó un patrón de alimentación para homogenizar las condiciones del tracto digestivo (Manzanilla *et al.*, 2004). Los cerdos fueron eutanasiados mediante una inyección intravenosa de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol S.A., Madrid, Spain) (200 mg/kg peso vivo). Los animales fueron sangrados y, posteriormente, se abrió la cavidad abdominal desde el esternón al pubis para obtener todo el tracto gastrointestinal. De cada animal, se recogió contenido digestivo del íleon, ciego y del colon proximal (aproximadamente 50 g) que fue congelado (-20°C) y liofilizado hasta el análisis de la concentración de las bases púricas.

Para el estudio de las comunidades microbianas mediante métodos de biología molecular (PCR-RFLP y PCR cuantitativa), se recogió aproximadamente 1 g de digesta del estómago (ST), del yeyuno distal (YD), del íleon (I), del colon proximal (PC) y del colon distal (DC). Las muestras fueron mezcladas con 3 mL de etanol al 98 % y guardadas a 4°C hasta su procesamiento (Murphy *et al.*, 2002).

Para la cuantificación de determinados grupos bacterianos mediante la técnica del FISH, se recogió contenido digestivo (500 mg) del estómago, del yeyuno distal, del colon proximal y del recto. Estas muestras fueron diluidas 10 veces en PBS y homogenizadas. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 700 g durante 1 minuto y 1 mL del sobrenadante fue fijado con paraformaldehído fresco al 4 %. Para la fijación de las células, las muestras fueron incubadas toda la noche a 4°C y finalmente congeladas a -80°C hasta su posterior análisis.

4.2.4. Procesado de las muestras

4.2.4.1. Extracción del ADN y técnica de PCR

Previamente a la extracción del ADN, se realizaron 2 lavados de cada una de las muestras con agua de peptona estéril (400 mg de contenido digestivo). El ADN fue extraído mediante la utilización del Mini kit QIAamp DNA Stool (Qiagen Inc., Chatsworth, Calif) siguiendo las instrucciones del fabricante con las modificaciones detalladas en el capítulo 3, apartado 3.2.4.1..

La PCR fue realizada mediante la utilización de la Master mix AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems, CA, USA) en un volumen total de 50 µl. La PCR consistía en 0,05 U/µl de AmpliTaq Gold polymerase, 0,8 µM de cada primer, 0,1% de tween 20, 5 µl de ADN (~100 ng) y agua autoclavada de 18 MΩ. El gen del 16S rRNA fue amplificado mediante la utilización de cebadores para eubacteria: 357fm (5'-CTACGGGAGGCAGCAGT-3') y 907rm (5'-CCGTCWATTCMTTGTGAGTTT-3') diseñados por Lane (1991) con alguna modificación menor. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: activación de la TaqGold a 94°C (4 min); 35 ciclos de desnaturalización a 94°C (1 min), *annealing* a 45°C (1 min) con un incremento de 0,1°C por ciclo, extensión a 72°C (1 min 15 s) y una extensión final a 72°C (15 min).

4.2.4.2. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

El producto de la PCR fue digerido mediante 4 enzimas de restricción: *AluI*, *RsaI*, *HpaII*, *CfoI* (F.Hoffmann-LaRoche Ltd Group, Basel, Switzerland) en cuatro reacciones totalmente independientes. La mezcla (10 µl en total) contenía 8 µl del producto de la PCR, 1 µl del buffer SA (F.Hoffmann-La Roche Ltd Group, Basel, Switzerland) y 1 µl (10 U) de una de las enzimas de restricción. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los diferentes fragmentos fueron separados con la técnica de la electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 2 % (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). El marcador "Step ladder 50 bp" (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) fue utilizado como marcador del peso molecular del ADN. A su vez, una mezcla del

producto de amplificación del gen del 16S rRNA, cortado con *RsaI*, de una mezcla de bacterias con secuencias conocidas (*Pasteurella multocida*, *Enterococcus faecalis* y *Clostridium perfringens*) se utilizó como control complementario de peso molecular. Las bandas de ADN fueron visualizadas tras exponerlas a la luz UV mediante la utilización de un transiluminador (Chemigenious Image System, SynGene, Cambridge, UK) y utilizando el software GeneSnap (SynGene Analysis Cambridge, UK. Versión 3.02.00). El tamaño de cada fragmento de restricción y la intensidad de las bandas fue calculado mediante el software Gene Tools Versión 3.02.00 (SynGene Analysis Cambridge, UK). Para reducir las variaciones subjetivas durante la observación de los geles, se descartaron los picos con una intensidad inferior a 60 unidades. El ruido de fondo fue eliminado utilizando el método del rolling-disk con un radio de 30. Finalmente, se obtuvo un total de 4 perfiles de bandas por cada muestra, correspondientes a los cortes con los 4 enzimas de restricción utilizados.

4.2.4.3. Análisis de los fragmentos de restricción

A partir del análisis de los fragmentos de restricción se calculó la diversidad bacteriana y el grado de similitud.

Para el cálculo de la **diversidad bacteriana** se utilizaron dos parámetros: el número total de bandas y el índice de Shannon-Weaver H' (Shannon y Weaver, 1963) tal y como se describe en el capítulo 3, apartado 3.2.4.3.

Para comparar la **similitud** de la composición de las bacterias entre las diferentes dietas experimentales y entre los diferentes tramos intestinales, se construyeron diferentes dendrogramas mediante el cálculo de la distancia de Manhattan (DM) (Kaufmann y Rousseeuw, 1990) tal y como se describe en el capítulo 3, apartado 3.2.4.3.

4.2.4.4. Reacción de la cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Los lactobacilos y las enterobacterias fueron cuantificados en muestras de íleon y colon proximal mediante la utilización de una PCR a tiempo real siguiendo los procedimientos descritos por Castillo y colaboradores (2006a). Las muestras fueron analizadas por duplicado.

4.2.4.5. Análisis de las bases púricas

La cuantificación de la concentración de las bases púricas (adenina y guanina) de las muestras de digesta del íleon, del ciego y del colon proximal (40 mg) fueron determinadas mediante HPLC (Makkar y Becker, 1999). Para este análisis, las bases púricas fueron hidrolizadas de la cadena del ácido nucleico e incubadas con 2 mL a 2M-HClO₄ a 100°C durante 1h, incluyendo 0,5 mL de 1 mM-alopurinol como marcador interno.

4.2.4.6. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Las muestras de digesta del estómago, del yeyuno distal, del colon proximal y del recto del tercer periodo fueron analizadas mediante las sondas: Bacterias totales (Eub 338-GCTGCCTCCCGTAGGAGT), *Streptococcus/Lactococcus* spp (Str493-GTTAGCCGTCCCTTTCTG) y la sonda *Lactobacillus/Enterococcus* spp (Lab158-GGTATTAGCA(C/T)CTGTTTCCA) siguiendo el método descrito por Harmsen y colaboradores (2002). En resumen, 10 µl de la suspensión de células fueron aplicados sobre portaobjetos cubierto con gelatina, la hibridación se llevó a cabo añadiendo 10 µl de cada sonda (50 ng/µl de la solución de stock) en 110 µl del tampón de hibridación, y dejando incubar durante toda la noche a 50°C para la sonda Str493 y a 45°C para la sonda Lab158. Para prevenir la pérdida de la fluorescencia, cada muestra fue cubierta por Vectachield (Vector Laboratories, Burlingame, California). Las células fluorescentes fueron cuantificadas con el microscopio de epifluorescencia Leica DMRXA. Se cuantificaron veinticinco campos a 1000x por cada muestra y por duplicado.

4.2.5. Análisis estadístico

El efecto de la dieta, del periodo experimental y del tramo gastrointestinal sobre el número de bandas fue examinado mediante la utilización de técnicas no paramétricas (Kruskall-Wallis), utilizando el programa estadístico SAS (SAS Institute, INC. 8.2, Cary, NC). Los resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$) fueron subsecuentemente analizados mediante el test de Wilcoxon (comparaciones 2x2) aplicando la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. El efecto de la

dieta, del periodo experimental y del tramo gastrointestinal sobre el índice de Shannon-Weaver y sobre la concentración de bases púricas fue analizado mediante el análisis de la variancia (procedimiento GLM). De los resultados obtenidos mediante la PCR cuantitativa se estudio el efecto de la dieta y del periodo mediante el procedimiento del GLM utilizando el test de ANOVA. De los resultados obtenidos del FISH se determinó el efecto de la dieta y del tramo digestivo mediante el mismo procedimiento. El cerdo fue usado como unidad experimental. Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

4.3. Resultados

4.3.1. Parámetros clínicos y productivos

No se detectaron síntomas clínicos en ninguno de los animales, exceptuando dos cerdos alimentados con la dieta SAL. Uno de estos animales tuvo diarrea durante el primer periodo y el otro animal presentó epidermitis exudativa.

La incorporación de fibra dietética (grupos GRO, PUL y SAL) disminuyó el consumo voluntario de pienso (Tabla 4.2.). En el caso de los animales alimentados con la dieta PUL, esta disminución del consumo voluntario de pienso coincidía con un menor peso de los animales. La eficiencia alimentaria de los animales alimentados con la dieta CT fue menor que en el resto de grupos experimentales.

Tabla 4.2. Peso vivo (kg), consumo voluntario de pienso (g/ animal día) y relación ganancia: consumo (G:C) de los cerdos alimentados con las dietas CT (Control), GRO (con maíz molturado de forma grosera), PUL (8 % de pulpa de remolacha) y SAL (10 % de salvado de trigo) a lo largo de todos los periodos experimentales.

	Periodo	Dietas				EEM ¹	Valor P		
		CT	GRO	PUL	SAL		Dieta	Periodo	Interacción
Peso vivo	1ero	19,57 ^a	19,56 ^a	18,88 ^a	19,72 ^a	0,534	<0,001	<0,001	0,006
	2ndo	28,53 ^a	28,39 ^{ab}	26,69 ^b	28,26 ^{ab}				
	3ero	43,45 ^a	43,92 ^a	40,13 ^b	41,64 ^{ab}				
Consumo	1ero	714	619	596	672	60,2	<0,001	<0,001	0,083
	2ndo	1266	1137	1086	1118				
	3ero	2186	2056	1745	1903				
	Total ²	1388 ^a	1271 ^b	1142 ^c	1231 ^{bc}				
G:C	1ero	0,8	0,92	0,81	0,87	0,023	0,007	<0,001	0,183
	2ndo	0,48	0,51	0,51	0,52				
	3ero	0,47	0,52	0,51	0,49				
	Total ²	0,54 ^b	0,59 ^a	0,57 ^a	0,58 ^a				

¹ EEM: Error estándar de la media

² Total: Hace referencia a la media de los consumos de los 3 períodos y el valor de G:C calculado para todo el experimento

^{a, b, c} Letras diferentes dentro de una línea implican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tramo ($p < 0,05$).

4.3.2. Diversidad bacteriana

4.3.2.1. Número de bandas obtenidas mediante PCR-RFLP

Como ya se ha comentado, la diversidad bacteriana se valoró a través del recuento del número de bandas obtenidas mediante PCR-RFLP. El valor promedio del número de bandas oscilaba entre 18 y 39 bandas. Como referencia general, se calculó el número de bandas en cada uno de los diferentes tramos del tracto digestivo bloqueando el efecto de la dieta y del periodo. Mediante este cálculo se observó que el yeyuno distal (26,7) y el íleon (24,0) tuvieron un menor número de bandas que el estómago (33,0), el colon proximal (36,5) y el colon distal (35,3) ($p < 0,05$).

La evolución del número de bandas a lo largo del estudio se muestra en la Figura 4.1.. Los animales alimentados con la dieta GRO tuvieron un incremento del número de bandas a corto plazo (a los 7 días) en los tramos digestivos más proximales (estómago, yeyuno distal e íleon) ($p < 0,05$ en estómago e íleon). Sin embargo, a largo plazo (21 y 42 días) se observó que el número de bandas en estos tramos o bien recuperaba los valores iniciales (estómago e íleon) o bien llegaba a valores inferiores (yeyuno distal). No se

observó ninguna diferencia significativa, en función del tiempo, en cuanto a la diversidad bacteriana del estómago y yeyuno distal de los animales alimentados con la dieta PUL o la dieta SAL.

En el íleon, después de 21 días, los animales alimentados con la dieta SAL tuvieron un menor número de bandas. Sin embargo, a los 42 días, el número de bandas era similar a los valores iniciales. Adicionalmente, en el tercer periodo (42 días) y en el mismo tramo intestinal, los animales alimentados con la dieta PUL tuvieron un menor número de bandas ($p < 0,05$).

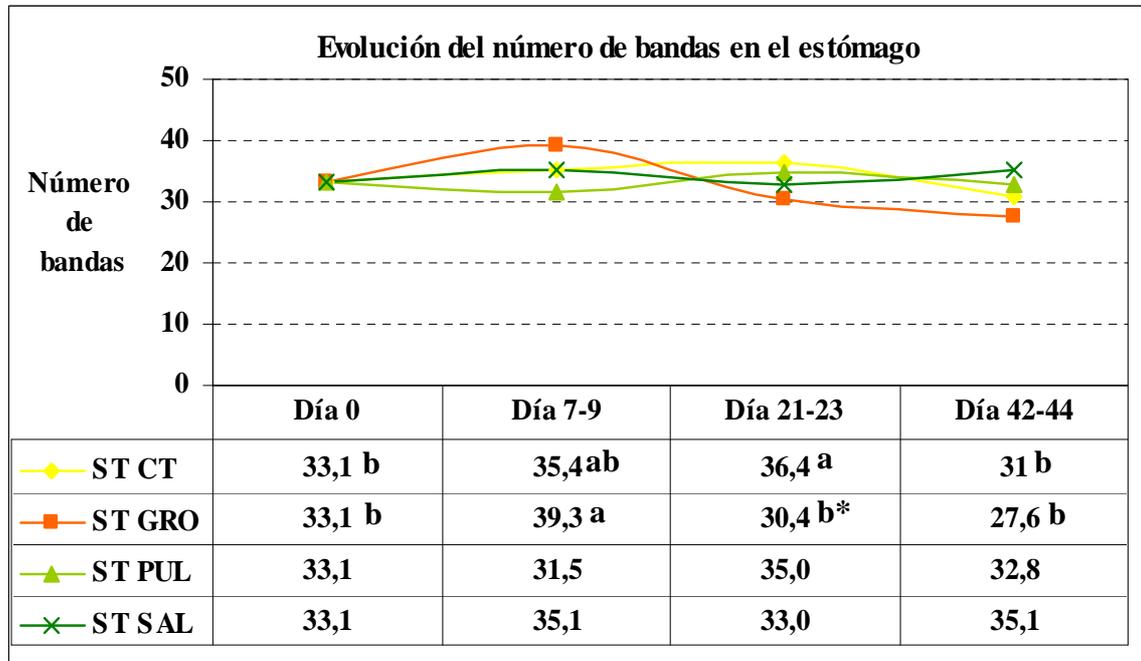
En cuanto al colon proximal, se observó una disminución global del número de bandas en todas las cuatro dietas experimentales a los 7 días del experimento ($p < 0,05$). Posteriormente, las diferencias más relevantes se observaron entre el primer y tercer periodo. Los animales alimentados con la dieta PUL tuvieron un número de bandas estable a partir de los 7 días y hasta el final del estudio. A pesar de que a los 21 días se observó que estos animales tenían un menor número de bandas que el grupo control, este cambio es debido a un incremento del número de bandas de los animales alimentados con la dieta CT y no a una disminución real del número de bandas de los animales de la dieta PUL. En este mismo tramo se observó una reducción del número de bandas en los animales alimentados con la dieta SAL en el tercer periodo ($p < 0,05$).

En el colon distal, también de forma general (en todas las dietas experimentales) se observó una reducción del número de bandas a corto plazo (7 días). Pasados los 7 primeros días, el valor del número de bandas fue más o menos estable a lo largo del resto del periodo experimental. Sin embargo, al final del estudio los cerdos alimentados con la dieta SAL tuvieron un mayor número de bandas comparado con los animales alimentados con la dieta CT ($p < 0,05$).

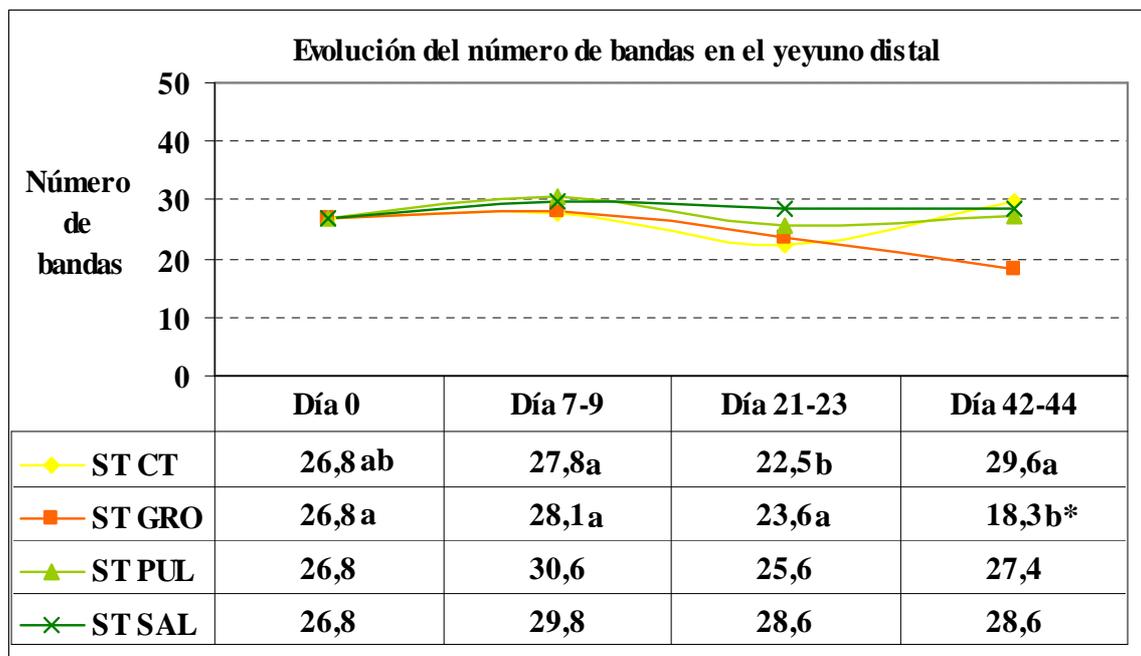
No se observaron diferencias significativas dentro de un mismo periodo experimental y entre los diferentes días de sacrificio (7 vs. 9, 21 vs 23, 42 vs. 44 respectivamente) en ninguno de los tramos del tracto digestivo analizados ($p > 0,05$).

Figura 4.1. Evolución del número de bandas obtenidas mediante PCR-RFLP en los diferentes tramos del tracto gastrointestinal y efecto de las diferentes dietas experimentales. El número de bandas corresponde al valor promedio del número de bandas obtenidas tras la PCR-RFLP en el estómago (A), yeyuno distal (B), íleon (C), colon proximal (D) y colon distal (E). Las diferentes letras (a,b) significan diferencias significativas entre los diferentes periodos y dentro de una misma dieta experimental. Los asteriscos (*) significan diferencias significativas entre una dieta experimental y la dieta CT dentro de un mismo periodo.

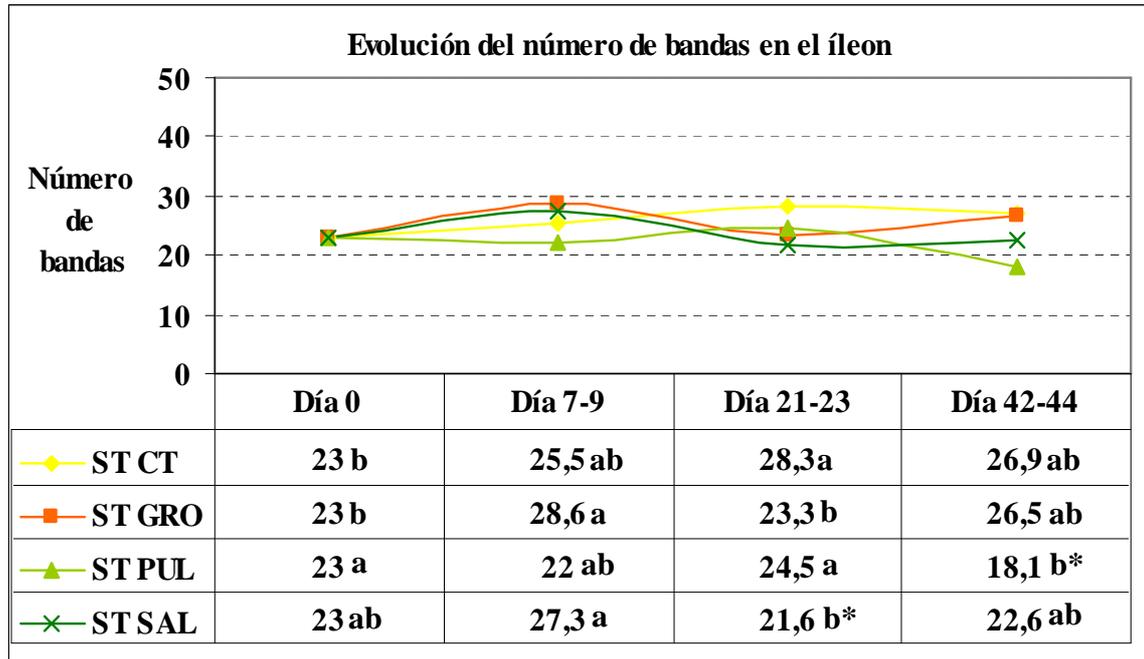
A)



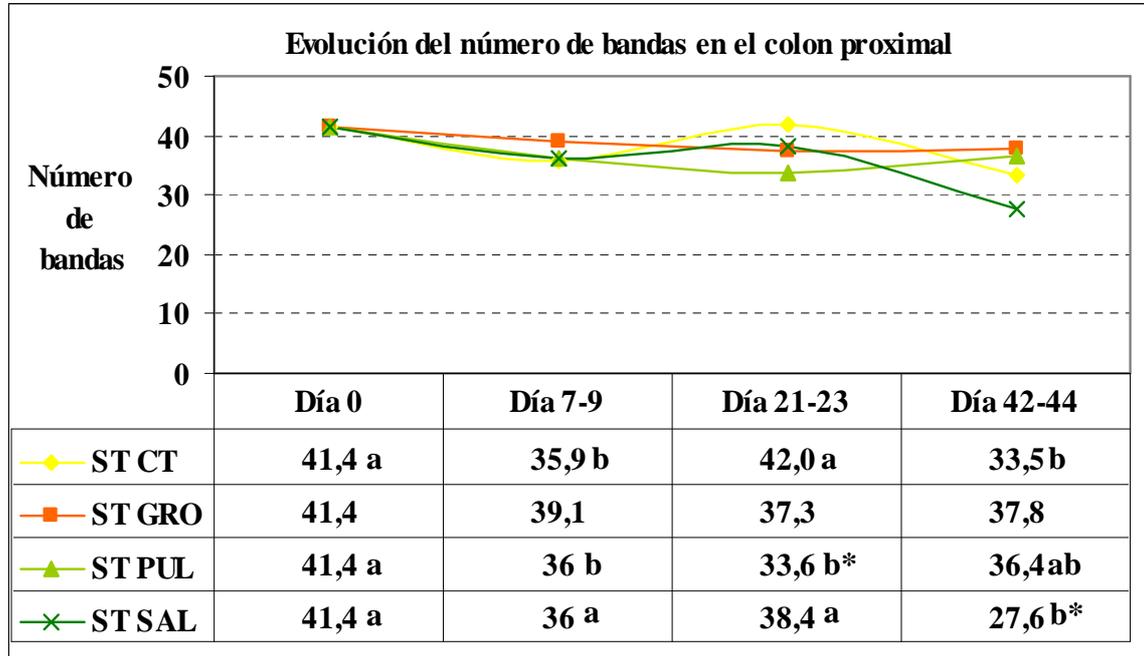
B)



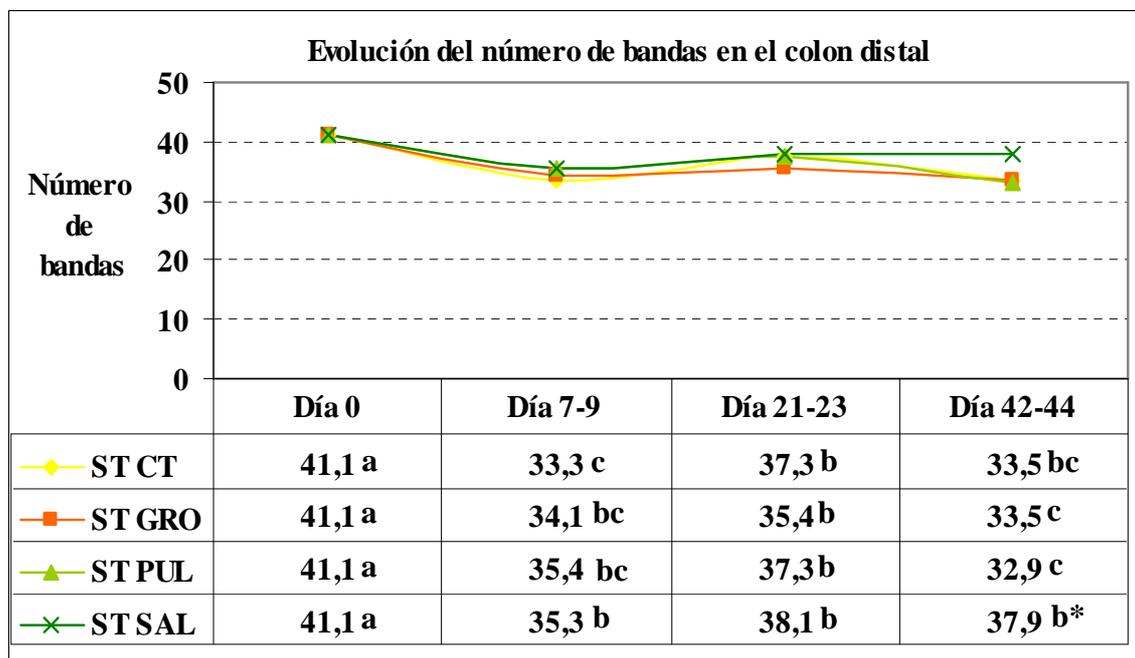
C)



D)



E)



4.3.2.2. Índice de Shannon – Weaver en el yeyuno distal y en el colon proximal

En el yeyuno distal se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las diferentes dietas experimentales (Tabla 4.3.). Estos cambios se observaron a largo plazo (días 21 y 42). A los 21 días, los animales alimentados con la dieta SAL presentaban una diversidad microbiana mayor que los animales alimentados con la dieta GRO y CT ($p < 0,05$). Al final del estudio (día 42) los animales alimentados con la dieta GRO presentaron una menor diversidad microbiana que el resto de dietas experimentales ($p < 0,05$).

En el colon proximal se observó un efecto significativo del periodo experimental en los animales alimentados con la dieta CT y SAL (Tabla 4.3.). En ambos casos se observó una disminución estadísticamente significativa de la diversidad bacteriana a los 42 días del estudio. Los animales alimentados con la dieta GRO y la dieta PUL tuvieron un grado de diversidad estable a lo largo del estudio. A corto plazo (7 días), no se observaron diferencias entre dietas y el grado de diversidad bacteriana ($p = 0,06$). En el último periodo (día 42) se observaron diferencias estadísticamente significativas entre

dietas, siendo la dieta SAL la dieta con el menor grado de diversidad bacteriana (Tabla 4.3.).

Al comparar el grado de diversidad entre el yeyuno distal y el colon proximal se observaron diferencias entre estos dos tramos (1,21 y 1,42, respectivamente) ($p=0,0001$).

Tabla 4.3. Efecto de la dieta y del periodo sobre el grado de diversidad microbiana en muestras de digesta del yeyuno distal (A) y del colon proximal (B). Las diferentes letras (a,b) significan diferencias significativas entre los diferentes periodos y dentro de una misma dieta experimental. Los asteriscos (*) significan diferencias significativas entre una dieta experimental y la dieta CT dentro de un mismo periodo. EEM=Error estándar de la media.

A)

Día	Dietas				EEM	p valor dieta	p valor periodo	p valor dieta*periodo
	CT	GRO	PUL	SAL				
0	1,22	1,22	1,22	1,22	0,034	0,0154	0,063	0,0012
7	1,22	1,24	1,26	1,25	0,014			
21	1,16	1,18	1,19	1,26*	0,013			
42	1,28	1,07*	1,24	1,22	0,021			

B)

Día	Dietas				EEM	p valor dieta	p valor periodo	p valor dieta*periodo
	CT	GRO	PUL	SAL				
0	1,44ab	1,44	1,44	1,44a	0,041	0,0046	0,0025	0,036
7	1,44ab	1,48	1,43	1,39ab	0,012			
21	1,5a	1,44*	1,4*	1,43a*	0,01			
42	1,37b	1,44	1,41	1,33b*	0,013			

4.3.3. Similitud bacteriana

Como se ha comentado previamente, el grado de similitud de las poblaciones bacterianas, entre las diferentes dietas y los diferentes tramos estudiados, se evaluó a través del cálculo de la DM y la posterior elaboración de dendrogramas.

Para comparar los diferentes tramos del tracto digestivo se elaboraron diferentes dendrogramas. Éstos fueron generados a partir de la comparación de los patrones de bandas de los diferentes tramos del tracto digestivo dentro de una misma dieta y periodo experimental. De los dendrogramas generados a partir de las muestras de los animales alimentados con la dieta CT (días 7, 21 y 42), con la dieta GRO (días 7 y 42), con la dieta PUL (días 7 y 42) y con la dieta SAL (días 21 y 42) se observó la formación de 2 *clusters*, uno constituido por muestras del tracto digestivo proximal (estómago, yeyuno distal e íleon) y el otro formado por muestras del tracto digestivo distal (colon proximal y colon distal). La Figura 4.2., que corresponde a las diferentes muestras del tracto digestivo de los animales alimentados con la dieta CT a día 7, es un ejemplo de esta distribución. Sin embargo, en el dendrograma generado con las muestras de los animales alimentados con la dieta SAL a día 7 y con las muestras de la dieta PUL a día 21 se observó que el estómago formaba un *cluster* bien diferenciado del resto de tramos del tracto digestivo (datos no mostrados). En el caso del dendrograma generado a partir de las muestras de digesta de los animales alimentados con la dieta GRO a día 21, se observó que el estómago se agrupaba con las muestras del tracto digestivo posterior (datos no mostrados).

En cuanto al efecto de la dieta, se pudieron observar claras diferencias entre periodos experimentales. A corto plazo, es decir a día 7 tras la introducción de la nueva dieta, se observó una buena agrupación entre las diferentes dietas experimentales en tramos proximales (yeyuno distal) pero no en tramos distales (colon proximal) (Figuras 4.3. y 4.5.). Sin embargo, a los 21 (datos no mostrados) y sobretodo a los 42 días (Figuras 4.4. y 4.6.) se pudo observar muy claramente la formación de diferentes grupos en función de la dieta experimental.

Concretamente en el yeyuno distal, a día 7, la dieta SAL dio perfiles de bandas similares a los de la dieta CT, mientras que las dietas GRO y PUL dieron perfiles diferentes a la dieta CT (Figura 4.3.). A día 21, la similitud de los perfiles cambió en el sentido de una mayor similitud entre la dieta CT y la dieta GRO, con perfiles claramente diferentes de los obtenidos con las dietas PUL y SAL (datos no mostrados). Finalmente, a día 42, los perfiles de la dieta PUL fueron los más similares a la dieta CT, mientras que los perfiles de las dietas GRO y SAL fueron claramente diferentes entre sí y a la dieta CT (Figura 4.4.).

En el colon proximal, a día 7 no se observaron agrupaciones claramente relacionadas con el tipo de dieta, aunque los perfiles de la dieta PUL tuvieron una tendencia a ser diferentes al resto de perfiles (Figura 4.5.). En cambio, a día 21, sí se observó una marcada tendencia a la agrupación de los perfiles de PCR-RFLP en función de la dieta (datos no mostrados). Esta tendencia a la agrupación en función de la dieta se mantuvo en último periodo, aunque los tratamientos CT y GRO dieron perfiles indistinguibles entre sí (Figura 4.6.).

Figura 4.2. Dendrograma ilustrando el porcentaje de similitud del patrón de bandas de los diferentes tramos del tracto digestivo obtenido mediante PCR-RFLP en el primer periodo de los animales alimentados con la dieta CT.

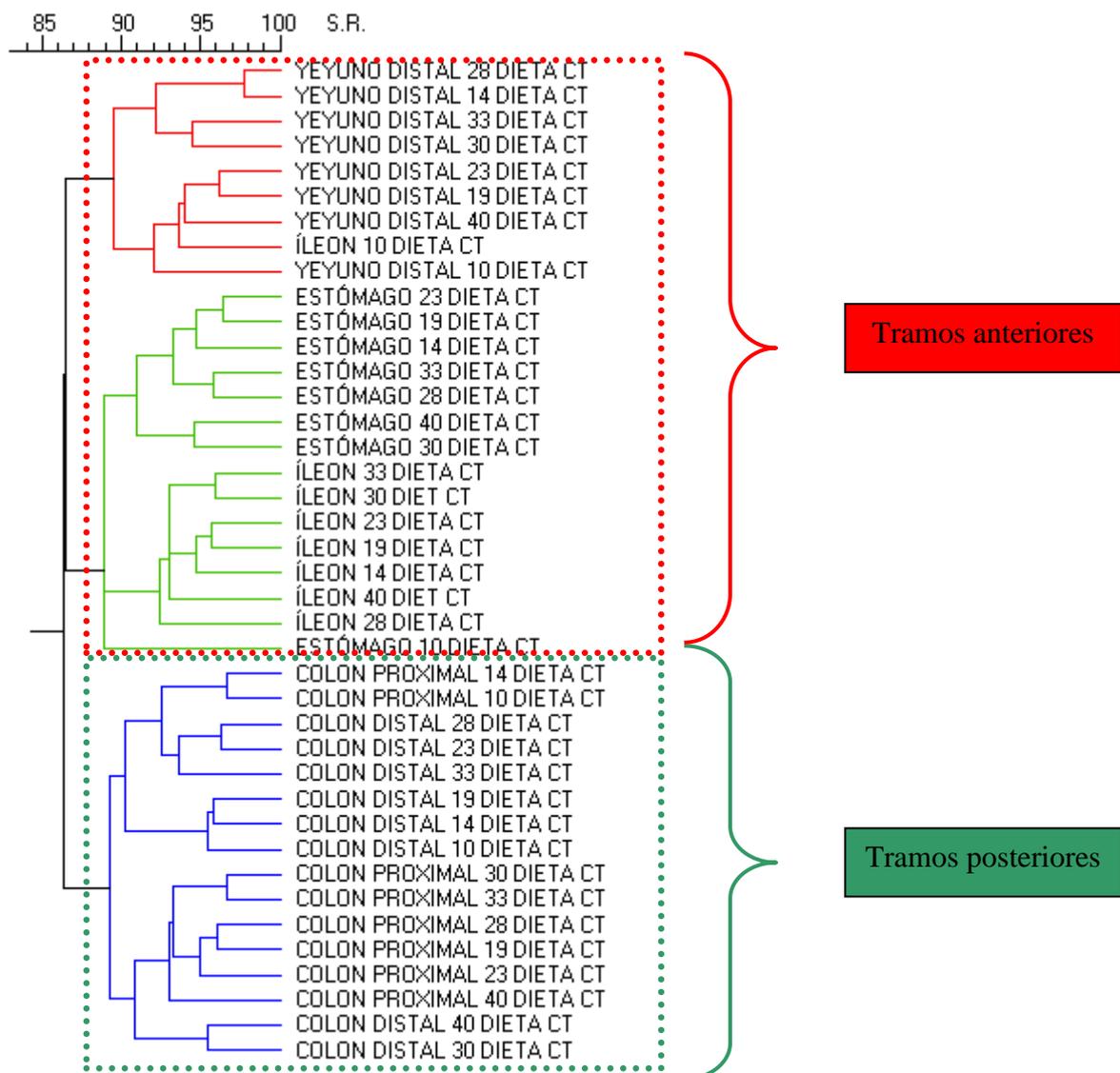


Figura 4.3. Dendrograma ilustrando el porcentaje de similitud del patrón de bandas obtenido mediante PCR-RFLP en el primer periodo y en el yeyuno distal.

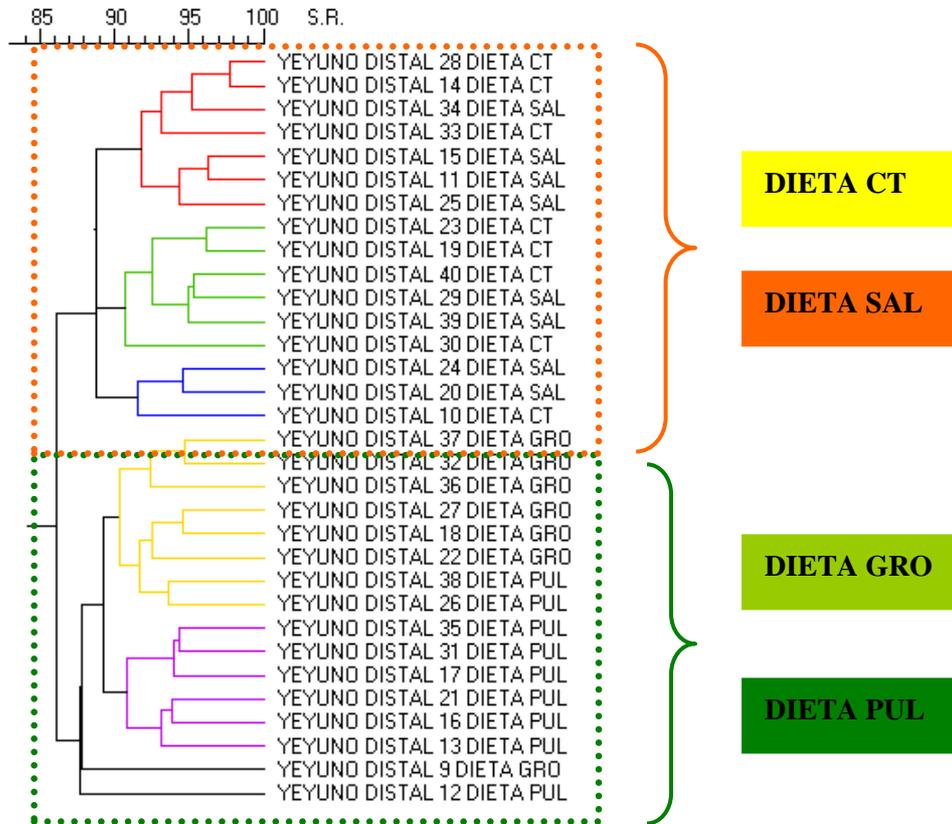


Figura 4.4. Dendrograma ilustrando el porcentaje de similitud del patrón de bandas obtenido mediante PCR-RFLP en el tercer periodo y en el yeyuno distal.

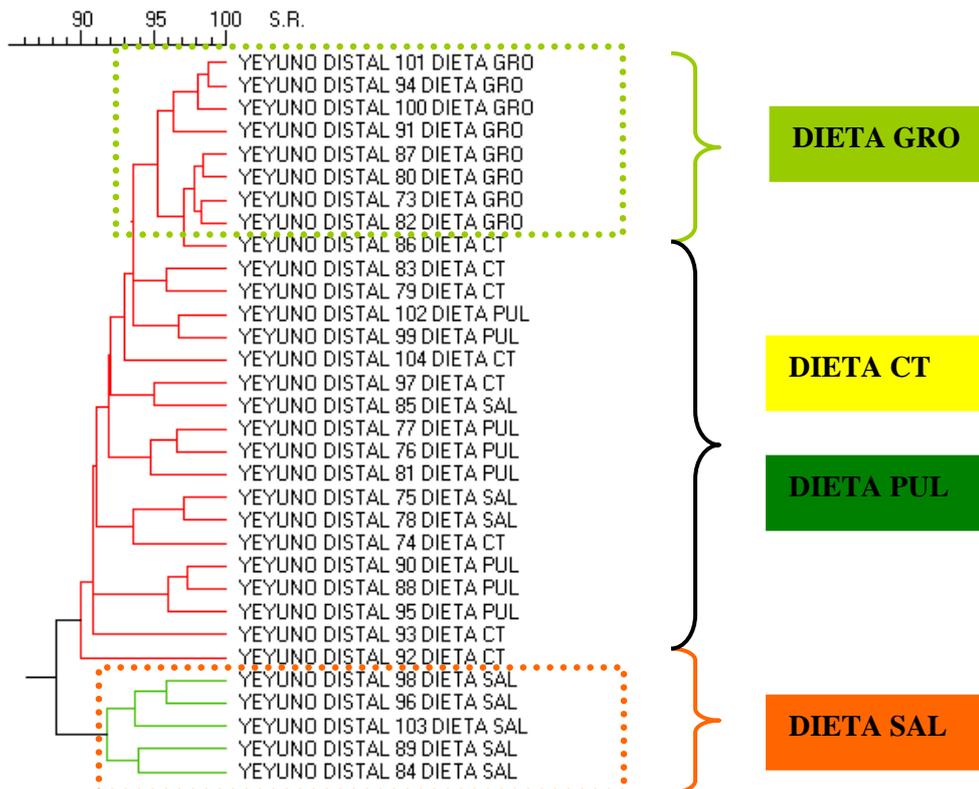


Figura 4.5. Dendrograma ilustrando el porcentaje de similitud del patrón de bandas obtenido mediante PCR-RFLP en el primer periodo y en el colon proximal.

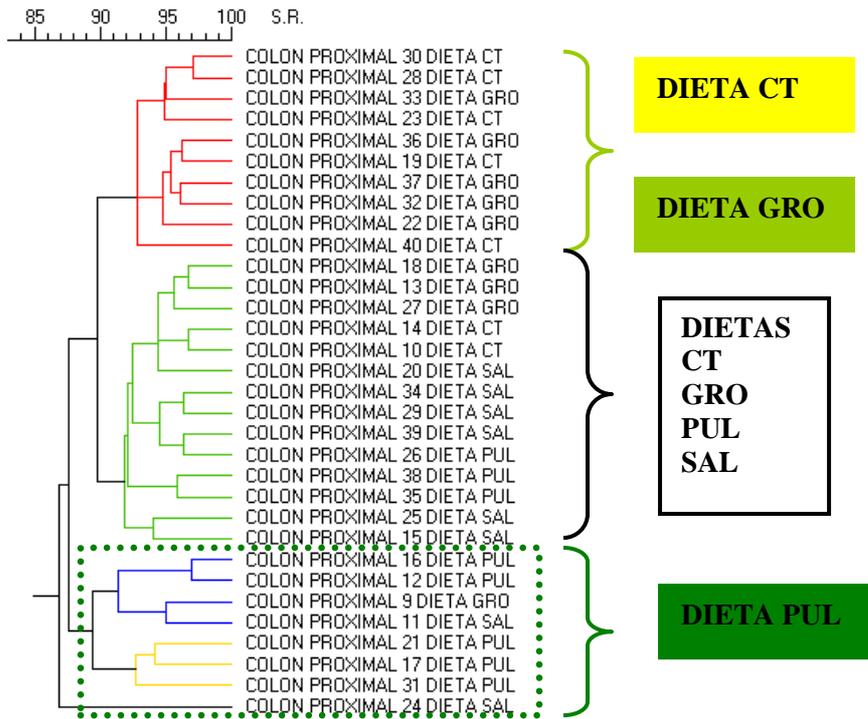
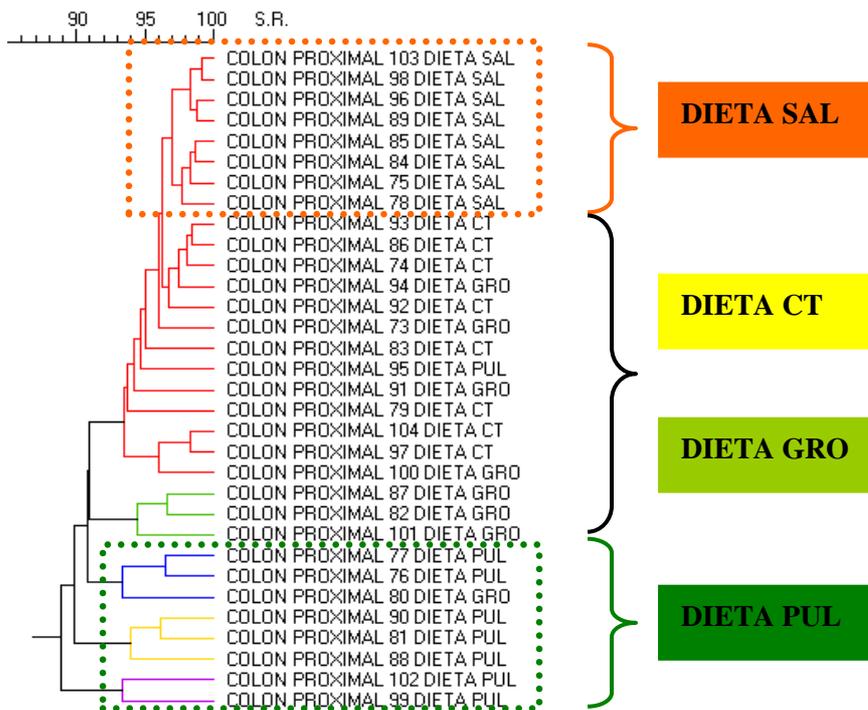


Figura 4.6. Dendrograma ilustrando el porcentaje de similitud del patrón de bandas obtenido mediante PCR-RFLP en el tercer periodo y en el colon proximal.



4.3.4. Cuantificación de las poblaciones de lactobacilos y enterobacterias mediante PCR cuantitativa

Los resultados del número de enterobacteria y lactobacilos cuantificados mediante PCR cuantitativa de las muestras tomadas de los contenidos del íleon y del colon proximal se muestran en las Tablas 4.4. y 4.5.. Tanto en el íleon como en el colon proximal, el total de enterobacterias fue inferior al de lactobacilos. No se encontraron diferencias significativas entre las diferentes dietas.

Se observó un efecto del periodo experimental tanto a nivel del íleon como del colon proximal. En ambos tramos se observó un incremento de los lactobacilos al poco tiempo de introducir las dietas experimentales (del día 0 al día 7). Sin embargo, estos valores volvieron al estado original a los 21 días y se mantuvieron estables hasta el final del estudio. También en el colon proximal se observó una disminución de la cantidad de enterobacterias durante el estudio.

Expresando la ratio lactobacilos:enterobacterias, tras su transformación logarítmica, se detectaron diferencias entre dietas a nivel del colon proximal. En el primer periodo, los animales alimentados con la dieta SAL mostraban una ratio lactobacilos:enterobacterias menor que el resto de dietas experimentales. En el segundo periodo, los animales alimentados con la dieta GRO tenían una menor ratio lactobacilos: enterobacterias que el grupo CT. Finalmente en el tercer periodo, no se observaron diferencias significativas entre las diferentes dietas.

Tabla 4.4. Población bacteriana de lactobacilos y enterobacterias en el contenido ileal analizado mediante PCR cuantitativa (log (16S rDNA copias del gen / g de materia fresca)) de cerdos alimentados con una dieta control (CT) o la misma dieta con maíz molturado de forma más grosera (GRO), con pulpa de remolacha (PUL) o con salvado de trigo (SAL). ¹ EEM Error estándar de la media.

Grupo bacteriano/periodo	Dietas				Promedio periodo	EEM ¹	p valor dieta	p valor periodo	p valor dieta*periodo
	CT	GRO	PUL	SAL					
Enterobacteria									
d0		9,27			9,27	0,36			
d7	9,11	8,6	8,92	9,78	9,10	0,34	0,11	0,64	0,48
d21	9,22	9,07	8,94	9,3	9,13	0,22	0,75		
d42	9,51	9,37	9,23	9,15	9,32	0,36	0,91		
Promedio dieta	9,28	9,01	9,03	9,41					
Lactobacilos									
d0		10,4			10,4ab	0,37			
d7	10,6	10,82	10,88	10,39	10,67a	0,35	0,45	0,005	0,625
d21	10,74	10,03	10,35	10,39	10,38ab	0,35	0,58		
d42	10,44	9,64	10,19	10,22	10,12b	0,26	0,27		
Promedio dieta	10,59	10,16	10,47	10,33					
Lactobacilos:enterobacteria									
d0		1,19			1,19ab	0,63			
d7	1,48	2,22	1,96	1,6	1,82a	0,52	0,73	0,03	0,848
d21	1,52	0,96	1,41	0,97	1,22ab	0,47	0,78		
d42	0,92	0,41	0,95	1,04	0,83b	0,49	0,85		
Promedio dieta	1,31	1,20	1,44	1,20					

Tabla 4.5. Población bacteriana de lactobacilos y enterobacterias en el contenido del colon proximal analizado mediante PCR cuantitativa (log (16S rDNA copias del gen / g de materia fresca)) de cerdos alimentados con una dieta control (CT) o la misma dieta con maíz molturado de forma más grosera (GRO), con pulpa de remolacha (PUL) o con salvado de trigo (SAL). ¹ EEM Error estándar de la media.

Grupo bacteriano / periodo	Dietas				Promedio periodo	EEM ¹	p valor dieta	p valor periodo	p valor dieta*periodo
	CT	GRO	PUL	SAL					
Enterobacteria									
d0		10,45			10,45a	0,19			
d7	9,84	10,03	9,42	10,41	9,93ab	0,29	0,14	0,0052	0,38
d21	9,08	9,77	9,25	9,21	9,33c	0,24	0,23		
d42	9,54	9,61	9,38	9,67	9,55b	0,23	0,82		
Promedio dieta	9,49	9,80	9,35	9,76					
Lactobacilos									
d0		11,26			11,26b	0,21			
d7	12,11	12,07	12,1	11,56	11,96a	0,25	0,35	0,026	0,214
d21	12,15	11,4	11,51	11,65	11,68ab	0,22	0,26		
d42	11,63	11,67	11,17	11,64	11,53b	0,21	0,3		
Promedio dieta	11,96	11,71	11,59	11,62					
Lactobacilos:enterobacteria									
d0		0,81			0,81	0,22			
d7	2,27a	2,04ab	2,67a	1,15b	2,03	0,36	0,04	0,2624	0,0225
d21	3,07a	1,63b	2,26ab	2,44ab	2,35	0,28	0,02		
d42	2,09	2,06	1,78	1,97	1,98	0,32	0,9		
Promedio dieta	2,09	2,06	1,78	1,97					

4.3.5. Cuantificación de los lactobacilos y los estreptococos del tracto gastrointestinal mediante la técnica del FISH

A partir de muestras del contenido del estómago, del yeyuno distal, del colon proximal y del recto de los animales del tercer periodo se cuantificaron las bacterias totales (sonda Eub 338), los *Streptococcus* spp /*Lactococcus* spp (sonda Str 493) y los *Lactobacillus* spp /*Enterococcus* spp (sonda Lab 158).

No se detectaron diferencias significativas en los recuentos de estas bacterias en función de las dietas utilizadas. Sin embargo se observaron diferencias significativas en función del tramo digestivo (especialmente entre los tramos proximales y los tramos más distales). Las bacterias del ácido láctico (lactobacilos y estreptococos) resultaron ser abundantes principalmente en el estómago (15-37%) y en el yeyuno proximal (8-26%) mientras que representaban un porcentaje bajo en el colon proximal y en el recto (1-2%) (Tabla 4.6.).

Tabla 4.6. Proporciones de *Lactobacillus* spp y *Streptococcus* spp a lo largo del tracto digestivo de cerdos alimentados con una dieta control (CT) o la misma dieta con maíz molturado de forma más grosera (GRO), con pulpa de remolacha (PUL) o con salvado de trigo (SAL) mediante la utilización de la técnica del FISH.

	Recuento ($\times 10^9$)/ml		Recuento como % Eub338	
	Eub338	Str493	Str493	Lab158
Estómago				
Dieta CT	0,12 \pm 0,11	20,2 \pm 9,4	8,0 \pm 17,5	
Dieta GRO	0,29 \pm 0,27	36,5 \pm 41,4	26,2 \pm 37,1	
Dieta PUL	0,53 \pm 0,49	14,9 \pm 5,3	21,7 \pm 16,2	
Dieta SAL	0,49 \pm 0,63	15,5 \pm 8,7	11,4 \pm 12,8	
Yeyuno distal				
Dieta CT	0,22 \pm 0,13	4,9 \pm 5,8	15,3 \pm 15,3	
Dieta GRO	0,37 \pm 0,50	25,7 \pm 22,6	11,0 \pm 12,4	
Dieta PUL	0,25 \pm 0,31	12,9 \pm 17,7	11,4 \pm 23,6	
Dieta SAL	0,12 \pm 0,11	31,1 \pm 36,2	25,0 \pm 47,1	
Colon Proximal				
Dieta CT	39,6 \pm 15,8	1,4 \pm 0,8	0,2 \pm 0,1	
Dieta GRO	44,5 \pm 10,0	1,2 \pm 1,1	0,1 \pm 0	
Dieta PUL	37,7 \pm 6,8	1,5 \pm 1,3	0,5 \pm 0,5	
Dieta SAL	37,7 \pm 6,4	1,0 \pm 0,3	0,1 \pm 0,2	
Recto				
Dieta CT	61,3 \pm 15,6	1,2 \pm 1,1	0,1 \pm 1,0	
Dieta GRO	49,6 \pm 9,5	1,8 \pm 1,5	0,1 \pm 0,1	
Dieta PUL	44,6 \pm 14	2,1 \pm 1,0	bd	
Dieta SAL	47,7 \pm 25,5	1,3 \pm 0,8	0,1 \pm 0,1	

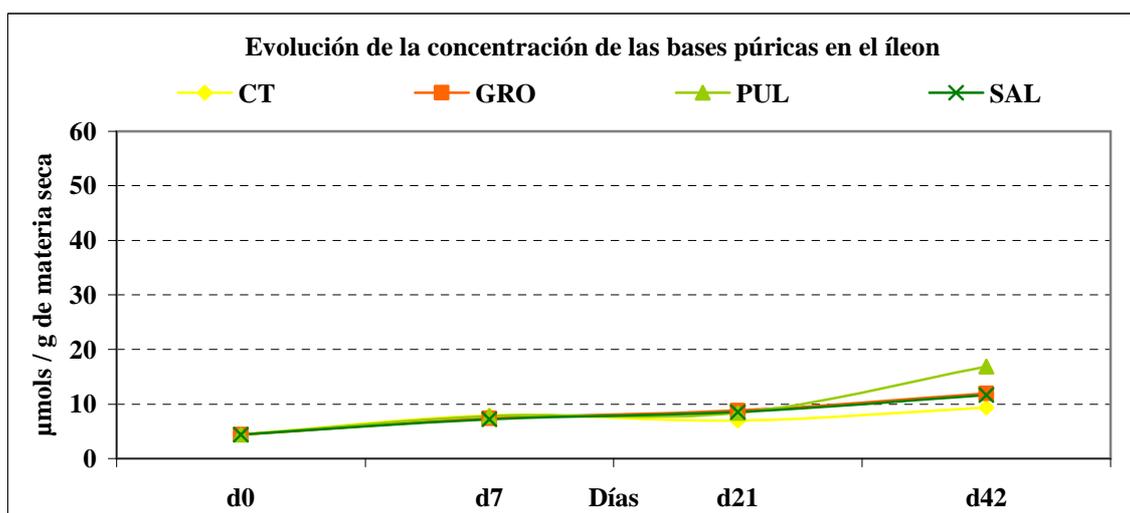
4.3.6. Análisis de las bases púricas

A partir de las muestras de digesta del íleon, ciego y del colon proximal se determinó la concentración de las bases púricas (adenina y guanina) (Figura 4.7.). Las concentraciones de bases púricas en el íleon fueron mucho menores que en el ciego y en el colon proximal. No se observaron diferencias significativas entre dietas en ninguno de los periodos experimentales ni en ninguno de los tramos estudiados.

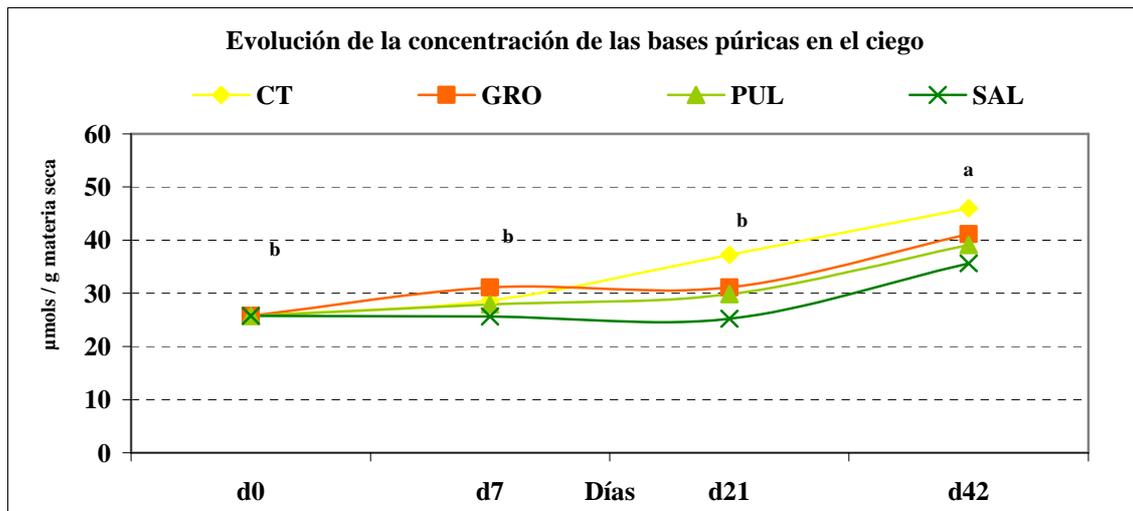
Se observó un efecto del periodo experimental tanto en el ciego como en el colon proximal ($p < 0,0001$). Mientras que en el ciego las concentraciones de las bases púricas aumentaron a lo largo del tiempo para todos los tratamientos, en el colon proximal las concentraciones de bases púricas aumentaron a corto plazo y disminuyeron con el tiempo.

Figura 4.7. Concentración de bases púricas (adenina y guanina) ($\mu\text{mol/g MS}$) en las muestras de digesta del íleon (A) del ciego (B) y del colon proximal (C) de cerdos alimentados con una dieta control (CT) o con la misma dieta con maíz molturado grosero (GRO), con pulpa de remolacha (PUL) o con salvado de trigo (SAL). Las diferentes letras (a, b) significan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes periodos.

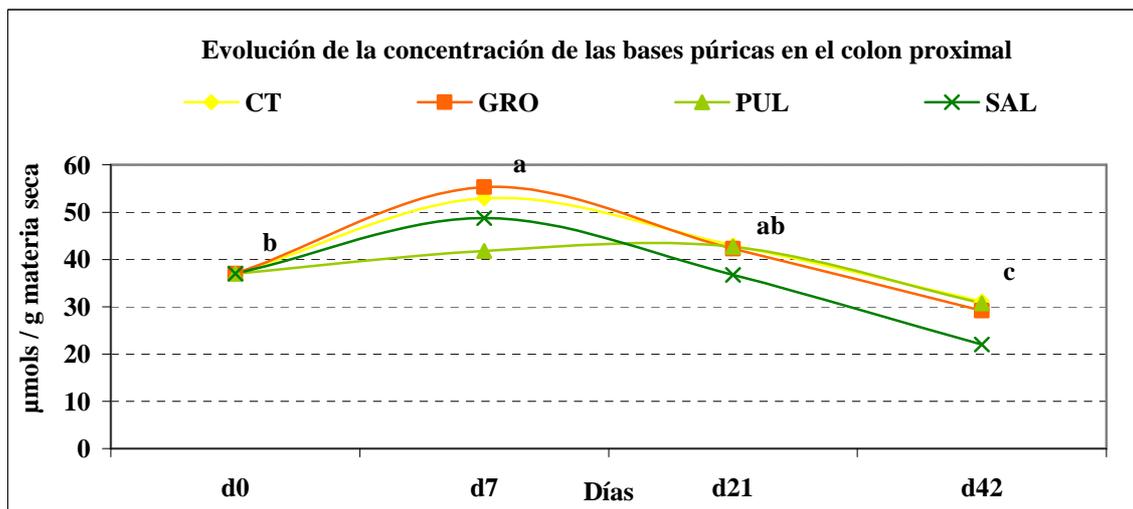
A)



B)



C)



4.4. Discusión

En este trabajo se evaluó el efecto de la adición de varias fuentes de carbohidratos (en forma de ingredientes fibrosos) sobre la microbiota gastrointestinal del cerdo, mediante técnicas moleculares, algunas de las cuales han sido ya discutidas en el capítulo anterior.

En primer lugar, cabe destacar que tanto la molturación grosera del maíz como la incorporación de la pulpa de remolacha y del salvado de trigo redujeron el consumo voluntario de pienso. Además, los animales alimentados con la dieta con pulpa de remolacha presentaron un menor peso vivo. Estos resultados confirman el efecto

limitante de la fibra dietética sobre el crecimiento, hecho que ya ha sido previamente demostrado (Kass *et al.*, 1980).

En este trabajo se detectaron diferencias significativas en cuanto a la diversidad de las poblaciones microbianas en función del tramo digestivo analizado. Concretamente, la diversidad microbiana incrementa de forma significativa de los tramos proximales (yeyuno distal e íleon) a los tramos intestinales más distales (colon proximal y colon distal), tal y como ya se había descrito en el capítulo 3. Sin embargo, en este caso, la diversidad microbiana detectada en el estómago fue considerablemente mayor, alcanzando valores similares a los obtenidos en el colon proximal y en el colon distal. En un trabajo realizado por Canibe y colaboradores (2005), en cerdos en fase de crecimientos (27 kg de peso vivo) y mediante la utilización de la técnica de la T-RFLP con una sola enzima de restricción, los autores detectaron entre 9 y 20 bandas en cada una de las muestras analizadas del contenido digestivo del estómago. Estos resultados parecen tener una buena correlación con los obtenidos en nuestro estudio (entre 27 y 39 bandas por muestra con 4 enzimas de restricción). Además, de los resultados derivados de la técnica del FISH, podemos afirmar que el incremento de la diversidad microbiana del estómago no fue acompañado por un incremento en la cantidad total de bacterias (valor promedio de 3.6×10^8 bacterias/mL). Sin embargo, en la mayoría de los dendrogramas realizados, las muestras de estómago se agrupan con las del intestino delgado (yeyuno distal e íleon); por lo tanto, se puede inferir que aunque la diversidad del estómago es alta, la composición bacteriana es mayoritariamente más parecida a la de los tramos proximales del intestino que a los tramos distales. Una posible explicación al incremento de la diversidad microbiana del estómago podría ser el hecho de que los animales hubiesen practicado coprofagia. De esta misma forma, Canibe y colaboradores (2005), mediante la técnica de la T-RFLP, observaron que muchos de los fragmentos de restricción encontrados en el colon de los cerdos alimentados con una dieta molturada groseramente eran también encontrados en el estómago de los mismos animales. Así, los autores sugerían la posibilidad de que estos animales hubieran practicado la coprofagia.

En los tramos del tracto digestivo posterior (colon proximal y colon distal), se observó de forma general (en todas las dietas experimentales) una reducción del número de bandas a corto plazo (de día 0 a día 7). Esta reducción súbita y transitoria es

probablemente debida a la introducción de la nueva dieta. No es descartable que estos cambios en la microbiota expliquen parte de la respuesta inflamatoria intestinal leve y transitoria, aunque más evidente en las dietas con ingredientes fibrosos, observada en estudios paralelos realizados en estos mismos animales (Nofrarías, 2007).

Analizando la similitud de los perfiles de bandas, se puede concluir que mayoritariamente a corto plazo no hay una buena agrupación de los patrones de bandas en función de la dieta administrada. Esto puede ser debido a que cada animal responde de forma variable al cambio de dieta y que son necesarios más días para adaptarse a las nuevas dietas. Con estas dietas se puede deducir que son necesarios aproximadamente unos 21-23 días para poder observar una homogenización de los perfiles bacterianos en función de la dieta. Ya a los 42 días, la similitud entre los animales alimentados con una misma dieta incrementa agrupándose en diferentes grupos en función de la dieta. En este periodo, una vez la microbiota ha tenido tiempo suficiente para adaptarse a las dietas experimentales, podemos observar que en el yeyuno distal, los animales alimentados con la dieta con salvado de trigo son los que presentan una menor similitud de los patrones de bandas. Interesantemente, en el colon proximal, los patrones de bandas entre las dos dietas con diferente grado de molturación del maíz eran más similares entre ellos que con las dietas con diferentes fuentes de fibra.

El objetivo principal de este trabajo era el de comparar el efecto de diferentes fuentes de carbohidratos sobre la microbiota gastrointestinal y, efectivamente, se ha demostrado que la introducción de diferentes fuentes de fibra induce cambios sustanciales en la microbiota gastrointestinal. Concretamente, la introducción del maíz molturado grosero indujo un incremento transitorio de la diversidad microbiana en los tramos del tracto digestivo más proximales (estómago e íleon) de una forma inmediata. En un estudio realizado por Canibe y colaboradores (2005), los autores también detectaron un incremento de la diversidad microbiana en el estómago de cerdos alimentados durante 10 días con una dieta molturada completamente en forma grosera. En este trabajo los autores además de detectar un incremento de la diversidad microbiana en los tramos proximales del tracto digestivo, también demostraron un aumento tanto del total de bacterias anaeróbicas como la cantidad de bacterias del ácido láctico. Sin embargo, en nuestro estudio, mediante la utilización de la PCR cuantitativa no se observaron diferencias significativas entre las diferentes dietas y la cantidad de *Lactobacillus* spp

presentes en el íleon. Además, en el trabajo realizado por Canibe y colaboradores (2005), los autores demostraron que la inclusión de una dieta molturada grosera aumentaba la concentración de ácido láctico y ácido butírico en el estómago. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Anguita (2006). Así, en este trabajo, utilizando las mismas muestras que las que se han utilizado en esta tesis, se observó un incremento de la proporción de ácido butírico en el estómago de los animales alimentados con la dieta parcialmente molturada de forma grosera. Este incremento se observó únicamente a los 7 días del estudio (Anguita, comunicación personal). Así, este incremento a corto plazo de la diversidad microbiana observada en los tramos proximales del tracto digestivo de los cerdos alimentados con la dieta rica en almidón resistente tipo I podría estar relacionado con un incremento de la diversidad de diferentes especies bacterianas formadoras de butirato o de especies bacterianas con capacidad de transformar el lactato en butirato. En el resto de tramos del tracto digestivo, la dieta enriquecida con almidón resistente tipo I mantuvo de forma más o menos estable el grado de diversidad bacteriana.

En los animales alimentados con la dieta con pulpa de remolacha no se observó ninguna diferencia significativa a lo largo de todo el estudio en cuanto a la diversidad bacteriana del estómago y yeyuno distal. Sin embargo, a largo plazo, en el íleon se detectó una disminución de la diversidad microbiana. Estos resultados son difíciles de interpretar ya que existen pocos estudios en la literatura donde se determine el efecto de diferentes fuentes de polisacáridos no amiloideos solubles sobre la diversidad microbiana global en los tramos proximales del tracto digestivo. En un trabajo realizado por Konstantinov y colaboradores (2004), los autores no detectaron diferencias significativas en el número total de bandas presentes en el íleon entre los lechones alimentados con la dieta control y los lechones alimentados con una dieta rica en polisacáridos no amiloideos solubles (10 % de pulpa de remolacha) durante los 13 días que duró la fase experimental.

El hecho de que la estabilización del número de bandas en los animales alimentados con la dieta con pulpa de remolacha se dé en un corto plazo de tiempo y se mantenga mayoritariamente estable a lo largo del estudio puede estar asociado a una más rápida adaptación de la microbiota a este ingrediente. Esta rápida adaptación de la microbiota intestinal podría estar relacionada con la mayor capacidad de retención de agua detectada en la dieta enriquecida con pulpa de remolacha (Anguita *et al.*, 2007). Este

medio facilitaría la fermentación bacteriana (Auffret *et al.*, 1993). Además de una más rápida adaptación de la microbiota intestinal a la dieta, se ha demostrado que los animales alimentados con esta dieta tienen un menor número de linfocitos intraepiteliales, de linfocitos de la lámina propia y una menor presencia de nódulos linfáticos en la mucosa del colon proximal (Nofrarías, 2007). Este hecho podría indicar que, además de permitir una mayor estabilidad de la microbiota intestinal, es una dieta menos abrasiva para el tracto digestivo.

En cuanto a la reducción de la diversidad microbiana ileal detectada a los 21 días en los animales alimentados con la dieta con salvado de trigo, podría también deberse a que la microbiota del íleon se estuviera especializando para fermentar este tipo de sustratos. En un estudio realizado por Hogberg y colaboradores (2004), los autores demostraron una disminución de la diversidad de los coliformes a nivel del íleon a los 9 días de haber introducido una dieta rica en polisacáridos no amiloideos insolubles (28,7 % de salvado de trigo). Sin embargo, la diversidad de los coliformes se recuperó a los 17 días de haber introducido la dieta experimental. Después de los 7 primeros días de adaptación a las nuevas dietas experimentales, las diferencias más relevantes, detectadas en los animales alimentados con la dieta con salvado de trigo, fueron encontradas en tanto en el colon proximal como en el colon distal. Concretamente, en estos animales, se observó en el colon proximal tanto una disminución del número de bandas como del índice de Shannon-Weaver a los 42 días del estudio. Esta reducción de la diversidad microbiana al final del estudio podría ser debida a una especialización de la microbiota que habita en este tramo. Sería interesante, en futuros estudios, analizar que poblaciones microbianas son predominantes. Además, esta reducción de la diversidad microbiana a los 42 días del estudio podría indicar que la adaptación a este tipo de sustrato es más tardía. En concordancia con estos resultados, algunos autores han sugerido que pocas bacterias son capaces de fermentar este tipo de polisacáridos hecho que podría explicar que en el último periodo se de una reducción de la diversidad bacteriana (Hogberg *et al.*, 2004). En el colon distal, al final del estudio los cerdos alimentados con la dieta rica en salvado de trigo tuvieron un mayor número de bandas comparado con los animales alimentados con la dieta control. Este resultado podría estar correlacionado con el observado en el colon proximal, donde la microbiota podría haberse especializado para fermentar este tipo de sustrato. Esto permitiría que en el colon distal llegaran las partículas parcialmente fragmentadas.

En este estudio, se observó que la concentración de las bases púricas del íleon fue considerablemente inferior a la concentración de las mismas en el ciego y en el colon proximal indicando que este tramo del tracto digestivo tiene una menor carga microbiana. Estos resultados concuerdan con los descritos por Castillo y colaboradores (2006b). El aumento en el contenido total de bases púricas en el ciego a lo largo del estudio, podría reflejar la adaptación de la microbiota de este compartimiento a la fermentación de las nuevas dietas. De esta forma, conforme la actividad fermentativa del ciego se incrementa, la cantidad de sustrato fermentable que abandona este compartimiento y llega a colon proximal es menor, lo que podría explicar el descenso paralelo observado en el colon proximal.

Mediante la cuantificación de los *Streptococcus/Lactococcus* spp y de los *Lactobacillus/Enterococcus* spp con la técnica del FISH, se pudo observar la existencia de una clara diferencia en cuanto a su distribución a lo largo del tracto digestivo, siendo estas bacterias muy abundantes en los tramos proximales del tracto digestivo (estómago y yeyuno proximal) y poco abundantes en los tramos distales del tracto digestivo (colon proximal y recto). En un estudio realizado por Hill y colaboradores (2005), los autores demostraron que el porcentaje mayoritario de clones aislados del íleon de los cerdos, pertenecía a bacterias de la familia *Lactobacillae*. Teniendo en cuenta estos resultados conjuntamente con la baja diversidad bacteriana detectada en el yeyuno distal y en el íleon, se puede deducir que las bacterias del ácido láctico van a ser de gran abundancia en estos tramos.

CAPÍTULO 5

INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON DOS CEPAS DE *SALMONELLA ENTERICA*
SEROVAR TYPHIMURIUM EN CERDOS

5.1 Introducción

La salmonelosis es actualmente, en los países industrializados, una de las enfermedades transmitidas por alimentos más importantes que afecta a la especie humana. En Europa los serotipos más comúnmente aislados en personas son *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium representando un 52 y un 9 % respectivamente del total de casos de salmonellosis en humanos (EFSA, 2006). Concretamente, las principales fuentes de estas bacterias son los huevos y la carne contaminada de cerdo y ave.

La infección por *Salmonella* spp en la especie porcina, puede cursar de forma subclínica, o bien de forma clínica, con una disminución del consumo de alimento, fiebre y diarrea abundante, (Schwartz, 1999). El curso subclínico es especialmente relevante en la epidemiología de esta infección dado el cerdo puede actuar como portador subclínico que, en situaciones de estrés (por ejemplo durante el transporte de los animales), puede convertirse en excretor, facilitando así la contaminación de las canales en el matadero (Isaacson *et al.*, 1999). De hecho, la carne de cerdo es la causante de entre un 9 y un 15 % de las salmonelosis humanas (Berends *et al.*, 1998; Hald *et al.*, 2004) y, por lo tanto, es importante conocer la dinámica de esta infección, para establecer un buen control.

El objetivo de este último trabajo fue estudiar la dinámica de la infección de dos cepas diferentes de *Salmonella* Typhimurium en cerdos, haciendo especial énfasis en estudiar el efecto de la infección sobre la diversidad microbiana del tracto digestivo, mediante las técnicas moleculares descritas en los capítulos anteriores.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Animales, alojamiento y manejo

La prueba fue realizada en la unidad experimental del *Laboratori de Sanitat Ramadera* (Zona Franca, Barcelona), con la aprobación previa de la Comisión de Ética para la Experimentación Animal y Humana de la *Universitat Autònoma de Barcelona*. Todos los procedimientos relacionados con animales fueron realizados de acuerdo con la normativa europea (Directiva 86/609/CEE).

Se utilizaron un total de 12 cerdos cruzados (Pietrain x [Landrace x Large White]) de 6 semanas de edad, machos y hembras mezclados, con un peso inicial de $14,2 \pm 1,7$ kg. Estos animales fueron obtenidos de una granja experimental *del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries* (Estació Experimental del Prat, Prat de Llobregat, España).

Durante la aclimatación de los cerdos (2 semanas), se recogieron muestras del pienso (día -7) y de heces de cada uno de los animales (día -7, -4 y día 0), para verificar que eran libres de *Salmonella* spp. También se recogieron muestras de sangre de los cerdos para confirmar que eran libres de anticuerpos frente a *Salmonella* spp.

Todos los cerdos fueron alimentados con un pienso compuesto comercial, que estaba formulado de acuerdo con los requisitos descritos para los cerdos de esta edad del *Nacional Research Council* (NRC, 1998, USA).

5.2.2. Infección experimental

Los cerdos fueron distribuidos en 3 grupos experimentales de acuerdo con su peso inicial. El grupo control no infectado (Grupo CT; n=2), fue alojado en una sala completamente separada del resto de grupos experimentales. Los otros dos grupos experimentales (n=5) fueron inoculados por vía oral, mediante la utilización de una jeringa, con 5 mL a 1×10^8 UFC de *Salmonella* / mL de dos cepas de *Salmonella* Typhimurium aislados de dos casos clínicos diferentes. Uno de los aislados de *Salmonella* Typhimurium presentaba resistencia múltiple a antibióticos (ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfamidas y tetraciclinas) (Grupo ST-R, cepa S-9398), mientras que el otro aislado era sensible a todos estos antimicrobianos (Grupo ST-S, cepa S-9610). Estos aislados fueron cedidos por la Dra. Montse Saco del *Laboratori de Sanitat Ramadera*. Los dos grupos de animales infectados se mantuvieron en la misma sala en corralinas diferentes separadas entre sí de forma sólida. Al grupo control se le administró el mismo volumen de tampón PBS por vía oral.

5.2.3. Controles y toma de muestras

La fase experimental duró 10 días. El peso corporal y el consumo de pienso fueron valorados a los 0, 3 y 10 días post-inoculación (PI). Los signos clínicos generales (0 = aspecto normal, 1 = abatimiento ligero, 2 = abatimiento severo, 3 = moribundo), la consistencia de las heces (0 = normales, 1 = pastosas, 2 = líquidas, 3 = con algo de sangre, 4 = muy sanguinolentas) y la temperatura rectal fueron registrados a día 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10 PI.

Para el estudio de la excreción de *Salmonella* Typhimurium se recogió contenido fecal a los 0, 1, 3, 7 y 10 días PI. Para descartar cualquier contaminación del pienso, se recogieron muestras de este al inicio del estudio. Para el estudio de la diversidad microbiana, 1 gr del contenido fecal fue recogido a los 0, 1, 3, 7 y 10 días PI y mezclado con 3 mL de etanol al 98 %. También para el estudio de la diversidad microbiana se recogieron muestras de contenido del ciego a los 10 días PI. Estas muestras fueron guardadas a 4°C hasta la extracción de ADN (Murphy *et al.*, 2002). También se recogieron muestras de sangre de los animales a los 0 y 10 PI para la determinación de anticuerpos frente a *Salmonella* Typhimurium.

Al final del estudio, los cerdos fueron sacrificados mediante una inyección intravenosa de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol S.A., Madrid, Spain) (200 mg/kg peso vivo). Se realizó la necropsia completa de todos los animales y se recogieron muestras de íleon, ciego, colon proximal, bazo, hígado y linfonodo mesentérico. Estas muestras fueron fijadas en formol al 10 %. Parte del bazo y del linfonodo mesentérico también se recogió en un recipiente estéril para su posterior estudio microbiológico.

5.2.4. Procesado de las muestras

5.2.4.1. Extracción del ADN y técnica de PCR

Previamente a la extracción del ADN, se realizaron 2 lavados de cada una de las muestras con agua de peptona estéril (400 mg de contenido digestivo). El ADN fue extraído mediante la utilización del Mini kit QIAamp DNA Stool (Qiagen Inc.,

Chatsworth, Calif) siguiendo las instrucciones del fabricante con las modificaciones detalladas en el capítulo 3, apartado 3.2.4.1..

La PCR fue realizada mediante la utilización de la Master mix AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems, CA, USA) en un volumen total de 50 µl. La PCR consistía en 0,05 U/µl de AmpliTaq Gold polymerase, 0,8 µM de cada primer, 0,1% de tween 20, 5 µl de ADN (~100 ng) y agua autoclavada de 18 MΩ. El gen del 16S rRNA fue amplificado mediante la utilización de cebadores para eubacteria: 357fm (5'-CTACGGGAGGCAGCAGT-3') y 907rm (5'-CCGTCWATTCMTTGTGAGTTT-3') diseñados por Lane (1991) con alguna modificación menor. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: activación de la TaqGold a 94°C (4 min); 35 ciclos de desnaturalización a 94°C (1 min), *annealing* a 45°C (1 min) con un incremento de 0,1°C por ciclo, extensión a 72°C (1 min 15 s) y una extensión final a 72°C (15 min).

5.2.4.2. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

El producto de la PCR fue digerido mediante 4 enzimas de restricción: *AluI*, *RsaI*, *HpaII*, *CfoI* (F.Hoffmann-LaRoche Ltd Group, Basel, Switzerland) en cuatro reacciones totalmente independientes. La mezcla (10 µl en total) contenía 8 µl del producto de la PCR, 1 µl del buffer SA (F.Hoffmann-La Roche Ltd Group, Basel, Switzerland) y 1 µl (10 U) de una de las enzimas de restricción. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los diferentes fragmentos fueron separados con la técnica de la electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 2 % (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). El marcador “Step ladder 50 bp” (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) fue utilizado como marcador del peso molecular del ADN. A su vez, una mezcla del producto de amplificación del gen del 16S rRNA, cortado con *RsaI*, de una mezcla de bacterias con secuencias conocidas (*Pasteurella multocida*, *Enterococcus faecalis* y *Clostridium perfringens*), se utilizó como control complementario de peso molecular. Las bandas de ADN fueron visualizadas tras exponerlas a la luz UV mediante la utilización de un transiluminador (Chemigenious Image System, SynGene, Cambridge, UK) y utilizando el software GeneSnap (SynGene Analysis Cambridge, UK. Versión 3.02.00). El tamaño de cada fragmento de restricción y la intensidad de las bandas fue

calculado mediante el software Gene Tools Versión 3.02.00 (SynGene Analysis Cambridge, UK). Para reducir las variaciones subjetivas durante la observación de los geles, se descartaron los picos con una intensidad inferior a 60 unidades. El ruido de fondo fue eliminado utilizando el método del rolling-disk con un radio de 30. Finalmente, se obtuvo un total de 4 perfiles de bandas por cada muestra, correspondientes a los cortes con los 4 enzimas de restricción utilizados.

5.2.4.3. Análisis de los fragmentos de restricción

A partir del análisis de los fragmentos de restricción se calculó la diversidad bacteriana y el grado de similitud.

Para el cálculo de la **diversidad bacteriana** se utilizaron dos parámetros: el número total de bandas y el índice de Shannon-Weaver H' (Shannon y Weaver, 1963) tal y como se describe en el capítulo 3, apartado 3.2.4.3..

Para comparar la **similitud** de la composición de las bacterias entre los diferentes grupos experimentales, se construyeron diferentes dendrogramas mediante el cálculo de la distancia de Manhattan (DM) (Kaufmann y Rousseeuw, 1990) tal y como se describe en el capítulo 3, apartado 3.2.4.3.

5.2.4.4. Cultivos bacterianos

El análisis de la excreción fecal de *Salmonella* spp se realizó mediante cultivos bacterianos. Las muestras de heces fueron homogeneizadas y sembradas en agua de peptona tamponada (ratio 1:10 a 37°C durante 18 -24 horas). Después de este tiempo de incubación, las muestras fueron homogenizadas y se traspasó 0,1 mL de este cultivo a un medio líquido de Rappaport-Vassiliadis (RV). La muestra fue incubada a 42°C durante 48 horas. Para el aislamiento e identificación, las muestras fueron sembradas en un medio sólido (Agar Medio Xilosa Lisina Tergitol - 4 XLT-4 Difco). Las placas fueron incubadas a 37° C durante 24 horas. Las colonias compatibles se sembraron en placas de Agar MacConkey. Las colonias lactosa negativas fueron identificadas por una batería de pruebas bioquímicas (Catalasa, Oxidasa, Citrato, Ureasa, Vogues-Proskauer,

Fenil-alanina, agar TSI (*Triple sugar Iron*) y agar SIM (Sulfuro indol movilidad)). Este procedimiento fue utilizado también para el análisis del pienso.

En el caso de los linfonodos mesentéricos y del bazo, estos órganos fueron sumergidos en etanol al 95 % y flameados. Posteriormente 1 g de tejido fue cortado en pequeños fragmentos y sembrado en agua de peptona tamponada. Se siguió el mismo procedimiento descrito para las heces y el pienso.

5.2.4.5. *Detección de anticuerpos frente a Salmonella spp*

Para la detección de los anticuerpos frente a *Salmonella* spp se analizaron las muestras de suero obtenidas a los 0 y 10 días PI mediante la utilización de un kit comercial de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Salmonella Covalent Mix-Elisa Suanova Biotech AB, Uppsala Sweeden).

5.2.4.6. *Estudio anatomopatológico*

Los tejidos fijados en formol al 10 % (íleon, ciego, colon proximal, bazo, hígado y linfonodo mesentérico) fueron posteriormente deshidratados a través de un gradiente de alcoholes y posteriormente incluidos en parafina. Los bloques fueron cortados a 4 µm de grosor y teñidos con hematoxilina-eosina (HE) para su posterior visualización al microscopio óptico.

5.2.5. **Análisis estadístico**

El efecto de la infección y el efecto día sobre los parámetros productivos (peso corporal y consumo voluntario de pienso), la temperatura rectal, y el índice de Shannon-Weaver fue analizado mediante el procedimiento GLM (general linear model) utilizando el programa estadístico SAS (SAS Institute, INC. 8.2, Cary, NC). La presencia de diarrea fue analizada mediante el test de Fisher. El efecto de la dieta y del día sobre el número de bandas fue examinado mediante la utilización de técnicas no paramétricas (Kruskall-Wallis). Los resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$) fueron subsecuentemente analizados mediante el test de Wilcoxon (comparaciones 2x2)

aplicando la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. El cerdo fue usado como unidad experimental. Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

5.3. Resultados

5.3.1. Parámetros clínicos y productivos

A los 10 días PI, los animales infectados con la cepa ST-R mostraron un menor peso corporal que los animales del grupo CT (CT = 19,25 kg, ST-R = 15,8 kg, ST-S = 17,2 kg, $p < 0,05$). A pesar de que las diferencias no fueron estadísticamente significativas, ambos grupos de animales infectados mostraron una disminución del consumo voluntario de pienso durante los 3 primeros días PI (CT = 1 kg/día, ST-R = 0,50 kg/día, ST-S = 0,50 kg/día). Al final del estudio, los animales infectados con la cepa ST-S recuperaron el consumo de pienso mientras que el grupo infectado con la cepa ST-R mantuvo un bajo consumo voluntario de pienso (CT = 0,87 kg/día, ST-R = 0,52 kg/día, ST-S = 0,72 kg/día; p valor = 0,13).

El resultado de las temperaturas rectales se muestra en la Figura 5.1.. Los animales infectados con la cepa ST-R tuvieron una temperatura rectal superior que el grupo CT durante el primer y segundo día PI ($p < 0,05$). Los animales infectados con la cepa ST-S tuvieron una mayor temperatura rectal únicamente el primer día PI ($p < 0,05$).

No se observaron signos clínicos de abatimiento en ninguno de los animales. En cuanto a la consistencia de las heces, éstas pasaron de una consistencia normal a una consistencia pastosa en uno o dos días PI, dependiendo de la cepa (Figura 5.2.). La presentación e intensidad de la diarrea fue variable a lo largo de los 10 días en ambos grupos inoculados, pero, en general, el grupo inoculado con la cepa ST-R presentó un mayor número de animales con heces pastosas.

No se observaron lesiones macroscópicas ni microscópicas relevantes en ninguno de los cerdos estudiados.

Figura 5.1. Evolución de la temperatura rectal media. Las diferentes letras (a, b) implican diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales.

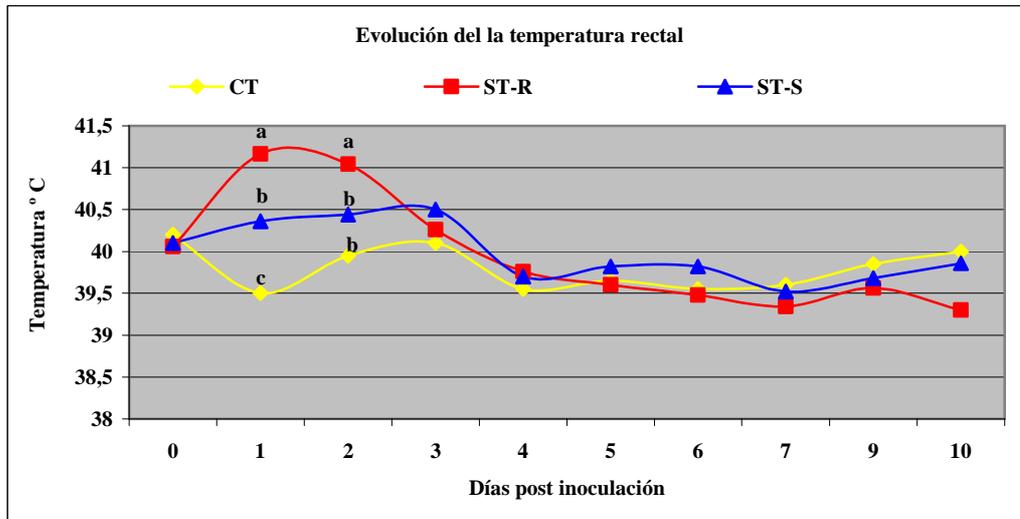
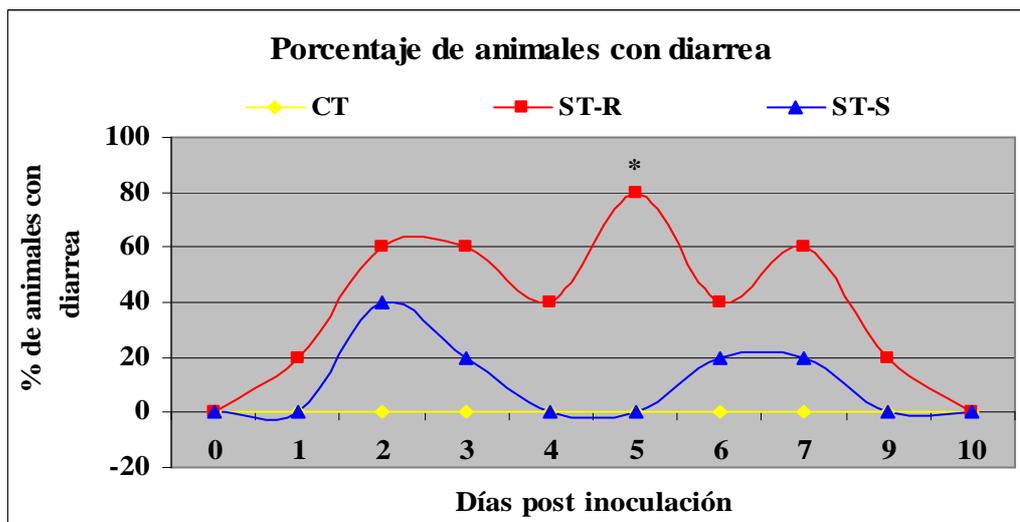


Figura 5.2. Porcentaje de animales con diarrea pastosa. El asterisco (*) indica que las diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,05$).



5.3.2. Detección de anticuerpos frente a *Salmonella* spp

Para la detección de los anticuerpos frente a *Salmonella* spp se analizaron las muestras de suero obtenidas a los 0 y 10 días PI. A día 0 ninguno de los animales presentó anticuerpos frente a *Salmonella* Typhimurium. A los 10 días PI, se detectaron anticuerpos frente a *Salmonella* Typhimurium en 3 de los 5 animales infectados con la cepa ST-R.

5.3.3. Excreción fecal y translocación

Como se puede observar en la Tabla 5.1., la duración de la excreción así como el número de animales excretadores varió con relación a la cepa inoculada. La mayoría de los animales inoculados con la cepa ST-R empezaron a excretar a las 24 horas de la inoculación y la excreción se mantuvo, en la mayoría de ellos, hasta el final del periodo experimental. Algunos de los animales tuvieron una excreción intermitente. En cuanto al grupo inoculado con la cepa ST-S, la excreción se inició también a las 24 horas, pero se mantuvo únicamente hasta el día 7 PI.

Tabla 5.1. Evolución del número de animales con excreción fecal de *Salmonella* Typhimurium a lo largo del estudio. (CT = cerdos no infectados, ST-R= cerdos infectados con una cepa resistente a múltiples antibióticos, ST-S = cerdos infectados con una cepa sensible a múltiples antibióticos).

	Grupo	Días post-inoculación				
		0	1	3	7	10
Excreción de <i>Salmonella</i> Typhimurium	CT	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	ST-R	0/5	3/5	4/5	4/5	3/5
	ST-S	0/5	2/5	4/5	3/5	0/5

Salmonella Typhimurium fue aislada del linfonodo mesentérico de todos los animales inoculados con la cepa ST-R (5/5) y en 2 de los 5 animales infectados con la cepa ST-S. No se aisló *Salmonella* spp en ninguna de las muestras de bazo ni en ninguno de los animales del grupo control. Tampoco se aisló *Salmonella* spp en en las muestras de pienso.

5.3.4. Diversidad bacteriana

5.3.4.1. Número de bandas obtenidas mediante PCR-RFLP

Se valoró la diversidad bacteriana del recto y del ciego a través del recuento del número de bandas obtenidas mediante PCR-RFLP. La diversidad microbiana del recto a lo largo del estudio mostró una evolución similar para todos los grupos experimentales, sin diferencias estadísticamente significativas entre los animales infectados y los animales controles (Figura 5.3.A). Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a

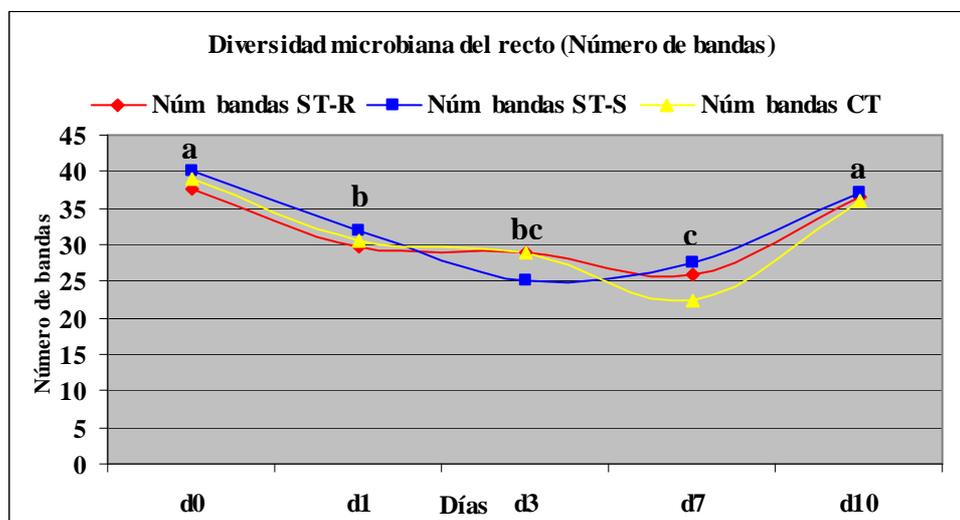
la diversidad microbiana del ciego a los 10 días PI entre los diferentes grupos experimentales (número de bandas de CT=33 ± 0, ST-R = 33,6 ± 3,67, ST-S = 34,8 ± 5,26). Sin embargo, se observó un efecto día a lo largo del estudio, con una disminución del grado de diversidad a día 1, 3 y 7 PI ($p < 0,05$).

5.3.4.2. Índice de Shannon–Weaver en el ciego y en el recto

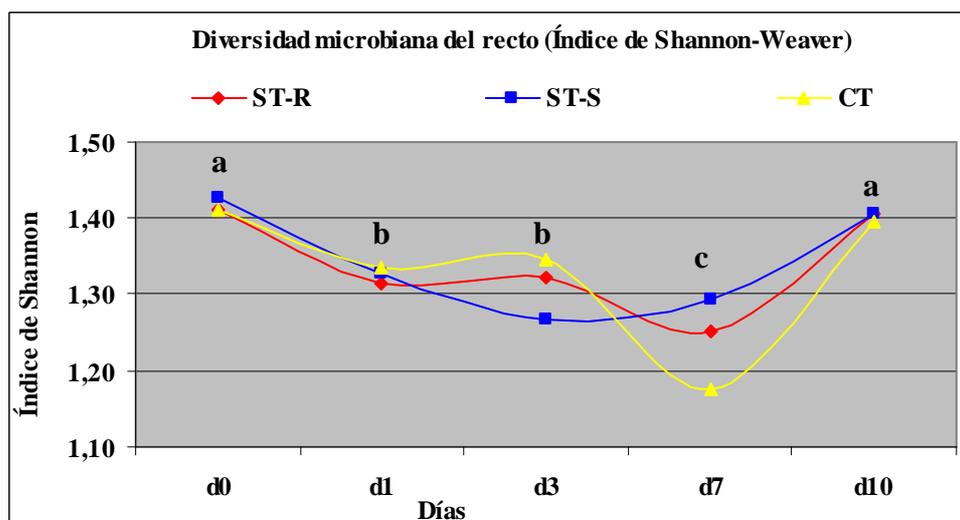
Mediante el cálculo del Índice de Shannon–Weaver se calculó también la diversidad microbiana de las heces y del contenido cecal. En el caso de las heces, se observó una dinámica muy similar a la obtenida mediante el cálculo del número de bandas (Figura 5.3.B). En este caso, a pesar de que tampoco se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0,75$), cabe resaltar que los animales del grupo CT presentaron una marcada reducción de la diversidad bacteriana a los 7 días del estudio. También se observó un efecto día a lo largo del estudio, con una disminución del grado de diversidad a día 1, 3 y 7 PI ($p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas en cuanto a la diversidad microbiana del ciego a los 10 días PI entre los diferentes grupos experimentales (índice de Shannon-Weaver de CT=1,35 ± 0, ST-R = 1,37 ± 0,05, ST-S = 1,41 ± 0,02; $p = 0,17$).

Figura 5.3. Evolución de la diversidad microbiana a lo largo del estudio en número de bandas (A) y en función del Índice de Shannon-Weaver (B). (CT = cerdos no infectados, ST-R= cerdos infectados con una cepa resistente a múltiples antibióticos, ST-S = cerdos infectados con una cepa sensible a múltiples antibióticos). Las diferentes letras (a, b, c) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes días del estudio.

A) Número de bandas



B) Índice de Shannon – Weaver.



A partir de las muestras de heces recogidas a los 0, 1, 3, 5, 7 y 10 días PI y de las muestras de contenido cecal recogido a los 10 días PI, se construyeron diferentes dendrogramas con el fin de comparar la similitud de los patrones de bandas de cada grupo experimental. En ninguno de los casos se observó una clara agrupación en función del grupo experimental.

5.4. Discusión

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el efecto de la infección con dos cepas diferentes de *Salmonella* Typhimurium en cerdos de engorde, valorando especialmente su efecto sobre la diversidad microbiana.

En nuestro estudio se observó que el grupo de cerdos infectados con la cepa ST-R presentó un menor peso corporal al final del estudio. Además, en ambos grupos infectados con *Salmonella* Typhimurium se observó una reducción del consumo voluntario de pienso, siendo más prolongado en los animales infectados con la cepa ST-R. En cuanto a la temperatura rectal, se observó un incremento durante el primer y segundo día PI. Estos signos clínicos tienen una buena concordancia con los descritos en la literatura (Schwartz, 1999). Sin embargo, hay que resaltar cierta variabilidad entre los estudios existentes. Así, Balaji y colaboradores (2000) demostraron que tras la infección por *Salmonella* Typhimurium, los animales perdían peso, tenían un menor consumo voluntario de pienso y tenían un largo periodo de fiebre (desde las 24 horas

post infección hasta las 120 horas). Por el contrario, los datos aportados por Correa-Matos y colaboradores (2003) y Mikkelsen y colaboradores (2004) demuestran que la infección con *Salmonella* Typhimurium puede cursar sin cambios de peso, consumo ni temperatura. Estas diferencias podrían explicarse en gran parte por la gran variabilidad de las cepas de *Salmonella* spp utilizadas en los diferentes estudios, las diferentes dosis de infección utilizadas así como también por posibles diferencias de susceptibilidad entre animales.

La excreción de *Salmonella* Typhimurium en heces ya se pudo detectar en algunos de los animales a las 24 horas después de la infección siendo, en algunos animales, discontinua a lo largo del periodo experimental. De forma general, se describe que después de la infección experimental, *Salmonella* Typhimurium es aislada de las heces diariamente durante los 10 primeros días PI y frecuentemente durante los siguientes 4 o 5 meses (Schwartz, 1999). En el caso de los animales infectados con la cepa ST-R aún se detectaban animales positivos a los 10 días PI, mientras que no fue así en el caso de los animales infectados con la cepa ST-S. Estas diferencias parecen indicar que la excreción podría depender del tipo de cepa utilizada. Recientemente, se ha demostrado que la excreción de *Salmonella* Typhimurium en heces está correlacionada con la concentración administrada de la misma durante la infección (Osterberg y Wallgren, 2008). Así, en este estudio, los autores demostraron que los cerdos infectados con $0,65 \times 10^9$ UFC presentaban una excreción constante a lo largo de las primeras 4 semanas post-infección, con una excreción intermitente en fases más avanzadas. Los cerdos infectados con $0,65 \times 10^6$ UFC tuvieron una excreción intermitente ya durante las primeras 4 semanas PI, mientras que en los cerdos infectados con $0,65 \times 10^3$ UFC no se detectó excreción. En nuestro estudio la infección experimental se realizó con 1×10^8 UFC de ambas cepas, sin embargo se observó una excreción intermitente ya durante los diez primeros días. Estos resultados pueden reafirmar que además de la dosis de infección utilizada, la excreción va a depender de la cepa administrada.

A pesar de que a los 10 días de la infección experimental los animales no presentaban ningún signo clínico, se aisló *Salmonella* Typhimurium en el linfonodo mesentérico de ambos grupos inoculados. Los linfonodos, son uno de los tejidos más sensibles para la detección de *Salmonella* spp (Vieira-Pinto *et al.*, 2005). Una vez *Salmonella* Typhimurium atraviesa la mucosa intestinal, llega al linfonodo mesentérico mediante la

vía linfática y puede quedarse acantonada en el linfonodo mesentérico o bien en tonsilas, ciego y colon (Vieira-Pinto *et al.*, 2005, Schwartz, 1999; Wood *et al.*, 1989). Este resultado confirmaría la posibilidad de persistencia de la infección y corroboraría el rol que pueden ejercer algunos animales infectados subclínicamente como portadores de *Salmonella* Typhimurium. Además, se ha demostrado que la excreción de *Salmonella* spp puede prolongarse hasta los 4 o 5 meses postinfección (Schwartz, 1999). No es descartable que en el presente estudio, los animales de ambos grupos pudieran volver a excretar *Salmonella* Typhimurium en fases más avanzadas.

Comparando los resultados obtenidos entre las dos cepas de infección utilizadas, éstos parecen indicar que la cepa resistente a múltiples antibióticos (ACSSuT) produce una sintomatología clínica más pronunciada (mayor pérdida de peso, peor recuperación del índice de conversión, temperatura rectal más elevada) y una excreción fecal más prolongada que la cepa sensible a múltiples antibióticos. Estas diferencias podrían ser debidas a la relación existente entre la resistencia a los antibióticos y la virulencia (Guerra *et al.*, 2002).

De forma general, se describe una relación entre la diversidad microbiana y la estabilidad de un ecosistema, siendo más estable cuando mayor es la diversidad de éste (Crutsinger *et al.*, 2006). En algunos estudios se ha demostrado una disminución de la diversidad microbiana tras la infección con un agente patógeno entérico (Bhandari *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2008). En el trabajo publicado por Bhandari y colaboradores (2008), los autores demostraron que los lechones infectados por *Escherichia coli* K88 con mayor sintomatología y mortalidad eran los que tenía una menor diversidad microbiana. Asimismo, Cao y colaboradores (2008) observaron una disminución de la diversidad microbiana de las heces en patos tras 24 horas de ser infectados con *Salmonella* Enteritidis. A diferencia de nuestro estudio, los animales infectados con *Salmonella* Enteritidis enfermaron gravemente y algunos de ellos murieron. Por este motivo, en el presente estudio, se esperaba observar una disminución de la diversidad microbiana tras la infección con *Salmonella* Typhimurium. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los animales infectados y los del grupo control. Cabe resaltar que en este estudio, para el análisis de la diversidad microbiana, sólo se recogieron muestras de contenido digestivo del ciego a día 10 PI y del recto a lo largo del estudio. Probablemente, y para futuros estudios, sería interesante realizar esta

prueba con un mayor número de animales realizando sacrificios seriados y recogiendo muestras de un mayor número de tramos digestivos. Otra posible causa que pudiera explicar el hecho de que no se observaran diferencias en la diversidad microbiana entre los grupos infectados y el grupo control puede ser el tipo de agente patógeno utilizado o la susceptibilidad de los animales.

Por último, la disminución de la diversidad microbiana a lo largo del estudio en todos los animales, incluidos los controles, podría estar relacionada con el estrés generado a los animales tras la administración del inóculo (PBS o *Salmonella* Typhimurium) y a su continua manipulación para la recogida de las muestras.

CAPÍTULO 6
DISCUSIÓN GENERAL

El principal objetivo de esta tesis fue el de mejorar el conocimiento del ecosistema bacteriano del tracto digestivo de los cerdos mediante la utilización de diferentes técnicas moleculares. Concretamente, esta tesis se focalizaba en el estudio de la composición de la microbiota intestinal a lo largo del tracto digestivo, estudiando el efecto de diferentes aditivos y dietas sobre las poblaciones bacterianas del tracto gastrointestinal.

La población microbiana del tracto gastrointestinal de los cerdos ha sido tradicionalmente estudiada mediante técnicas de cultivo bacteriano (Robinson *et al.*, 1981; Robinson *et al.*, 1984). Sin embargo, en esta tesis se optó por la utilización de diferentes técnicas moleculares descritas recientemente. Mediante la utilización de la técnica de la PCR-RFLP, pudimos monitorizar los cambios generales que se pueden dar en las poblaciones bacterianas al introducir una nueva dieta, a lo largo del tracto digestivo o bien con el paso del tiempo. La utilización de esta técnica, puede ser interesante en fases preliminares ya que con ella vamos a poder obtener una idea global de los cambios que se pueden dar en el ecosistema bacteriano intestinal. Esta información nos permitirá seleccionar o a descartar algunas dietas experimentales etc. Posteriormente, si se considera necesario, se va a poder clonar y secuenciar algunas de las bandas obtenidas. Esto nos aportará una información más detallada y limitará el número de muestras secuenciadas. Otra ventaja de esta técnica es que con ella estamos analizando tanto bacterias cultivables como bacterias no cultivables o bacterias no caracterizadas aportando una mayor información que la que se puede obtener a partir del cultivo de algunos grupos bacterianos.

Además, para el estudio de la abundancia de un determinado grupo o género bacteriano, en el experimento II, se utilizó la técnica de la PCR cuantitativa (cuantificando los lactobacilos y las enterobacterias) y la técnica del FISH (cuantificando *Streptococcus* spp, *Lactococcus* spp, *Lactobacillus* spp y *Enterococcus* spp). Mediante ellas no se observaron diferencias significativas entre las diferentes dietas experimentales. Por este motivo, en futuros estudios sería interesante ampliar la batería de sondas o de cebadores para cuantificar más grupos o géneros bacterianos como *Ruminococcus* spp etc. Ambas técnicas aportan una información detallada de la abundancia de un determinado género o grupo bacteriano. De esta forma, se puede afirmar, que con la utilización combinada de la PCR-RFLP y la PCR cuantitativa o la técnica del FISH se va a poder obtener un

mejor conocimiento de la composición microbiana del tracto digestivo, ya que con la PCR-RFLP se va a obtener una información general mientras que con la PCR cuantitativa o con el FISH se va a obtener una información más concreta de determinados grupos bacterianos. En definitiva, la combinación de una técnica cualitativa (en este caso la PCR-RFLP) y una técnica cuantitativa (PCR cuantitativa o FISH) parece interesante ya que aportan una información complementaria.

Aunque el estudio de la diversidad microbiana del tracto digestivo es actualmente de gran interés y algunos autores lo consideran un parámetro que se correlaciona directamente con la salud intestinal (Atlas, 1984), no está aún totalmente demostrada la repercusión que un alta o baja diversidad intestinal tiene en la funcionalidad del sistema digestivo y, en definitiva, en el animal. En macroecología, se describe una relación entre la diversidad microbiana y la estabilidad de un ecosistema, siendo más estable cuando mayor es la diversidad (Crutsinger *et al.*, 2006). Además, se ha demostrado que cuando incrementa la diversidad microbiana en el suelo, disminuye la invasividad y la persistencia de fitopatógenos (Berg *et al.*, 2002; van Elsas *et al.*, 2002). En el área de estudio de la diversidad bacteriana del sistema digestivo, existen varios trabajos que apuntan también hacia este sentido. En concreto, en un estudio realizado por Deplancke y colaboradores (2000), comparando la diversidad ileal en cerdos neonatos alimentados por vía enteral o por vía parenteral, los autores observaron una relación inversa entre la diversidad bacteriana y la susceptibilidad del intestino a ser colonizado por *Clostridium perfringens*. Concretamente, los animales alimentados por vía parenteral tenían una menor diversidad bacteriana y eran portadores de una mayor concentración de *Clostridium perfringens*. En esta misma línea, un trabajo reciente realizado por Bhandari y colaboradores (2008) demostró que los lechones infectados por *Escherichia coli* K88 presentaban un mayor grado de sintomatología y una tasa mayor de mortalidad cuanto menor era el grado de diversidad microbiana intestinal. En un estudio realizado por Leser y colaboradores (2000), los autores demostraron una fluctuación de los patrones de bandas tras la infección de los animales con *Brachyspira hyodysenteriae*. Concretamente, desaparecieron un total de 39 fragmentos en uno o más grupos experimentales y apareciendo 18 nuevos fragmentos, sugiriendo una desestabilización de las poblaciones bacterianas, que parece relacionarse con una disminución en el grado de diversidad bacteriana. Así pues y a pesar de la escasa información existente, el principio que se acepta en macroecología de que un sistema diverso es más estable,

podría también ser aplicado para el ecosistema intestinal, siendo el sistema digestivo de un animal más estable y, por lo tanto más “saludable”, cuanto mayor fuera su diversidad bacteriana.

Otro parámetro que se venía utilizando y que se sigue utilizando actualmente como indicador de salud intestinal es la ratio *Lactobacillus:Enterobacterias*. De esta forma, se asume que una mayor ratio de *Lactobacillus:Enterobacterias* es beneficiosa para la salud del animal (Ewing y Cole, 1994). El interés en estas dos bacterias se debe a que se asocia un efecto favorable con los *Lactobacillus* spp. mientras que las *Enterobacterias* han sido relacionadas con problemas patológicos. Por este motivo, el objetivo de nuevas dietas que se diseñan especialmente para cerdos jóvenes, es mantener una ratio *Lactobacillus:Enterobacterias* favorable.

A pesar de que el grado de diversidad microbiana y la ratio *Lactobacillus:Enterobacterias* se calculan mediante la utilización de parámetros completamente diferentes, ambos índices se utilizan como indicadores de salud intestinal. Por este motivo, creímos interesante intentar dilucidar si existía alguna correlación entre estos dos parámetros en los experimentos que se describen en esta tesis. En el caso del experimento I, la alimentación con una dieta con butirato de sodio resultó en una mayor estabilidad intestinal (incremento de la diversidad bacteriana observado en los tramos del tracto digestivo posterior). Sin embargo, en estos mismos animales, Castillo y colaboradores (2006b), utilizando las mismas muestras que las utilizadas en esta tesis, no observaron modificaciones en la ratio *Lactobacillus:Enterobacterias* ni en el yeyuno distal ni en el ciego. En el caso de los animales alimentados con la dieta con extractos de plantas, debido a la disminución de la diversidad bacteriana detectada en los tramos posteriores del tracto digestivo, pensaríamos que estos animales tienen una menor estabilidad intestinal en esta parte del tracto digestivo. Sin embargo, en estos animales, Castillo y colaboradores (2006b) detectaron una mayor ratio *Lactobacillus:Enterobacterias* en el ciego. Por último, en el caso de los animales alimentados con la dieta con avilamicina, no se observaron modificaciones en la diversidad bacteriana ni en la cantidad de *Lactobacillus:Enterobacterias*. Esta baja o nula correlación entre los resultados de ambas técnicas podría ser debida, como ya hemos apuntado anteriormente, a que miden parámetros completamente diferentes (cantidad de bacterias de un determinado género bacteriano y diversidad bacteriana

global). Además, de estos resultados se puede deducir que es posible modificar la diversidad microbiana global sin modificar la cantidad relativa de *Lactobacillus* y *Enterobacterias*.

Tanto en el experimento I como en el experimento II, se observó que la diversidad microbiana incrementa significativamente de los tramos intestinales proximales a los tramos intestinales distales. Además, cuando los patrones de bandas fueron analizados mediante la creación de dendrogramas también se observó este efecto del tramo digestivo. Con ambos resultados, se puede sugerir que para futuros estudios de diversidad microbiana del tracto digestivo de los cerdos, sería suficiente el análisis del yeyuno/íleon, como muestra representativa del tracto digestivo proximal, y del ciego o el colon, como muestra representativa del tracto digestivo más distal. Además, debido a que en el experimento I se observaron diferencias significativas entre las diferentes dietas experimentales a nivel del tracto digestivo posterior, la inclusión de tramos posteriores del tracto digestivo podría ser de interés para futuros estudios sobre aditivos en dietas porcinas.

Otro aspecto importante a resaltar es que únicamente en el experimento I se observó un efecto del día de sacrificio sobre la diversidad microbiana. Concretamente en algunos tramos intestinales se observó una disminución de la diversidad microbiana del primer al segundo día de sacrificio. Este efecto se observó de forma global para todas las dietas experimentales. Esta reducción de la diversidad bacteriana en el grupo sacrificado en el segundo día podría estar relacionada con el estrés que se pueda generar a los animales al sacrificar la mitad del grupo experimental y a la necesidad de reestablecer la jerarquía del grupo. En otras circunstancias se ha demostrado que tras un estrés agudo, las poblaciones bacterianas del tracto digestivo pueden alterarse rápidamente (Williams *et al.*, 2008). En cambio, en el experimento II, no se observó ningún efecto sacrificio ya que en este caso se utilizaron 2 réplicas diferentes para cada grupo experimental, instaladas en diferentes corralinas. De esta manera, cada día de sacrificio se sacrificaban 4 animales de cada dieta experimental de una de las dos réplicas. Por este motivo consideramos importante tener en cuenta la organización de los sacrificios y en general el manejo de los animales, para próximos estudios de diversidad microbiana del tracto digestivo.

En el experimento II, se observó que es necesario un cierto tiempo para la adaptación digestiva a una nueva dieta. En algunos estudios se sugiere que son necesarias unas 2 semanas para adaptarse a las nuevas dietas (Key y Mathers, 1995). Con nuestros resultados, podemos deducir que el tiempo de adaptación a una nueva dieta es variable en función del tipo de sustrato utilizado. Además es muy probable que la cantidad de sustrato introducido en la dieta tenga también un efecto sobre el tiempo necesario para la adaptación a la nueva dieta.

La introducción del maíz molturado grosero modifica principalmente la diversidad microbiana en los tramos proximales del tracto digestivo (estómago e íleon) de una forma inmediata aportando una mayor estabilidad al ecosistema bacteriano. Sin embargo, estos animales recuperaron los valores iniciales a los 21 días de la prueba y se mantuvieron estables hasta el final de la prueba. Estos resultados tienen una buena correlación con los resultados obtenidos por Canibe y colaboradores (2005). De esta forma, parece probable que la introducción de forma puntual de maíz molturado groseramente en determinados momentos de la producción pueda ser interesante para incrementar la diversidad bacteriana y la estabilidad del ecosistema bacteriano mejorando la salud intestinal. Así, en humanos con cólera, la administración de almidón resistente reduce la duración de la diarrea al cabo de pocas horas (Ramakrishna *et al.*, 2000).

En el íleon, tras 42 días con las dietas experimentales se observó una disminución de la diversidad bacteriana en los animales alimentados con la dieta rica en pulpa de remolacha. En la literatura existen algunos trabajos donde se analiza el efecto de la incorporación de la pulpa de remolacha sobre la diversidad bacteriana global del íleon (Konstantinov 2003, 2004). Sin embargo, en estos estudios no se analiza el efecto de su inclusión a largo plazo. Concretamente, en el caso del trabajo realizado por Konstantinov y colaboradores en el 2004, no se detectaron diferencias significativas en cuanto al grado de diversidad bacteriana ileal entre el grupo control y los animales alimentados con la dieta que contenía pulpa de remolacha durante los 10 días que duró la fase experimental.

Otra diferencia entre nuestros resultados y los obtenidos por Konstantinov y colaboradores (2004) es que en, este último trabajo, los autores detectaron un

incremento de la concentración de *Lactobacillus* spp en el íleon de los animales alimentados con la dieta que contenía pulpa de remolacha, mientras que en nuestro estudio no se detectó ninguna modificación sobre este grupo bacteriano. Estas diferencias pueden ser debidas al hecho de que en nuestro estudio sólo se analizó el efecto de la inclusión de la pulpa de remolacha en la dieta mientras que en el estudio realizado por Konstantinov y colaboradores (2004) se utilizaba una mezcla de diferentes carbohidratos altamente fermentables (mezcla de pulpa de remolacha, fructooligosacáridos, lactulosa e inulina).

En este mismo grupo experimental, alimentado con pulpa de remolacha, las diferencias más relevantes en el colon proximal fueron encontradas en el primer periodo. Pasados estos primeros 7 días, los animales alimentados con la dieta rica en pulpa de remolacha presentaron un número de bandas y un índice de Shannon-Weaver estable a lo largo del resto del estudio. Con estos resultados podríamos deducir que mediante la utilización de pulpa de remolacha se mantienen de forma más o menos estable la diversidad bacteriana en el colon proximal. Konstantinov y colaboradores (2003), alimentando lechones con una dieta rica en pulpa de remolacha (con un 10 %) o bien con una dieta con pulpa de remolacha y fructooligosacáridos (5 % y 2,5 % respectivamente) detectaron un incremento en el número de bandas y del índice de diversidad de las heces tras 13 días de la introducción de estas dietas. En el trabajo realizado por Konstantinov y colaboradores (2004) con diferentes fuentes de carbohidratos altamente fermentables (mezcla de pulpa de remolacha, fructooligosacáridos, lactulosa e inulina), los autores también demostraron una mayor diversidad microbiana y una estabilización más rápida de las poblaciones bacterianas del colon proximal.

En el colon proximal, se observó una reducción del grado de diversidad bacteriana en los animales alimentados con la dieta rica en salvado de trigo en el tercer periodo. Esta reducción de la diversidad microbiana al final del estudio podría ser debida a que este tipo de sustratos (difícilmente fermentables) pueden necesitar más tiempo para que la microbiota sea capaz de adaptarse y de especializarse para poder fermentar este tipo de carbohidratos. Algunos autores han sugerido que pocas bacterias son capaces de fermentar este tipo de polisacáridos (Hogberg *et al.*, 2004). Este hecho podría explicar la disminución de la diversidad observada. Además, esta disminución de la diversidad podría estar relacionada con una especialización de las bacterias de este tramo digestivo

(Hogberg *et al.*, 2004). En el colon distal, al final del estudio se observó un mayor grado de diversidad bacteriana. Este resultado podría estar correlacionado con el observado en el colon proximal. Después de 42 días con esta dieta experimental, la microbiota del colon proximal podría haberse especializado para fermentar este tipo de sustrato, permitiendo que las partículas llegaran parcialmente fermentadas y fueran más fácilmente fermentables por la microbiota del colon distal.

Globalmente, con los resultados obtenidos en el experimento I y el experimento II, es difícil llegar a conclusiones sobre el grado de “salud intestinal”, ya que tampoco se observaron muchas diferencias en los parámetros productivos o patológicos de los animales de los diferentes grupos experimentales. En este caso, hubiera sido interesante realizar una infección experimental para determinar si los animales con mayor o menor diversidad / homogeneidad eran más o menos resistentes a una determinada infección.

En el experimento III, esperábamos observar una disminución de la diversidad microbiana tras la infección con *Salmonella* Typhimurium, sin embargo no se observaron diferencias significativas entre estos grupos y el grupo control. En este estudio, los animales infectados con *Salmonella* Typhimurium padecieron una clínica muy débil. De esta forma, podría ser que el grado de diversidad microbiana se afectara en función del grado del cuadro clínico y en definitiva del agente patógeno utilizado. Además, probablemente hubiese sido interesante realizar un muestreo más amplio, con sacrificios seriados a diferentes tiempos y recogiendo muestras tanto de contenido como de mucosa de algún tramo digestivo proximales (por ejemplo del íleon), para poder llegar a descartar posibles variaciones transitorias de la diversidad intestinal.

Concluir que, a pesar de que mediante la utilización de diferentes técnicas moleculares vamos a obtener una información mucho más amplia de la composición bacteriana del tracto digestivo, la interpretación de resultados generados es con frecuencia compleja. Las diferentes técnicas moleculares, nos han aportado más piezas del puzzle que configura la microbiota intestinal. Sin embargo, va a ser necesario más tiempo y conocimientos para comprender la colocación exacta de cada pieza y poder entender este cuadro complejo que representa el sistema digestivo.

CAPÍTULO 7
CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta tesis doctoral se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- 1- Mediante la utilización de la técnica de PCR-RFLP se pueden detectar cambios en la diversidad y homogeneidad de las poblaciones bacterianas del tracto digestivo.
- 2- La diversidad microbiana incrementa significativamente de los tramos proximales a los tramos intestinales distales del tracto digestivo de la especie porcina.
- 3- La incorporación de un 0,3 % de butirato de sodio en dietas para lechones destetados incrementa la diversidad microbiana en los tramos digestivos posteriores y mejora la ganancia media diaria de peso.
- 4- La incorporación de una mezcla de extractos de plantas (0,03 %) que contiene carvacrol (*Origanum* sp), cinamaldehído (*Cinnamomum* sp) y oleoresina de capsicum (*Capsicum annum*) en dietas para lechones destetados reduce el grado de diversidad microbiana en los tramos digestivos posteriores, pero mejora la ganancia media diaria de peso.
- 5- El tiempo de adaptación de la microbiota del tracto digestivo a diferentes fuentes de fibra dietética es variable en función del tipo de sustrato utilizado.
- 6- La incorporación de pulpa de remolacha (8%) en la dieta de cerdos de engorde podría facilitar la adaptación de la microbiota a este ingrediente, ya que la estabilización de la diversidad bacteriana se da en un corto plazo de tiempo y se mantiene mayoritariamente estable a lo largo del estudio.
- 7- La introducción del maíz molturado grosero en dietas para cerdos de engorde induce un incremento súbito y transitorio de la diversidad microbiana en los tramos del tracto digestivo más proximales (estómago, yeyuno distal e íleon), mientras que la introducción de salvado de trigo provoca una disminución tardía de la diversidad bacteriana en tramos digestivos más distales (colon proximal).

- 8- La infección de los cerdos con las cepas utilizadas de *Salmonella* Typhimurium produce un cuadro clínico leve y transitorio, empeorando los parámetros productivos y excretándose de forma discontinua a lo largo del periodo experimental.

- 9- La infección con las cepas utilizadas de *Salmonella* Typhimurium no modifican el grado de diversidad bacteriana de las heces de los cerdos a lo largo de un periodo experimental de 10 días. Tampoco modifican la diversidad del contenido cecal de los cerdos a 10 días postinfección.

CAPÍTULO 8
BIBLIOGRAFÍA

- Abe, F., Ishibashi, N., Shimamura, S., 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J Dairy Sci* 78, 2838-2846.
- Adami, A., and Cavazzoni, V., 1999. Occurrence of selected bacterial groups in the faeces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic. *J Basic Microbiol* 39, 3-9.
- Andrés, N., 2006. Efecto de los nucleótidos y la pulpa de garrofa sobre la salud intestinal de lechones destetados. Treball de Recerca. Bellaterra, Barcelona: Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Anguita, M., 2006. Physicochemical characteristics of vegetal feedstuffs in growing pig diets: Influence of the carbohydrate fraction on the energy value and the gastrointestinal tract environment. PhD Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Anguita, M., Gasa, J., Nofrarías, M., Martín-Orúe, S.M., Pérez, J.F., 2007. Effect of coarse ground corn, sugar beet pulp and wheat bran on voluntary intake and physicochemical characteristics of digesta of growing pigs. *Livest Sci* 107, 182-191.
- Argenzio, R.A., 1993. Gastrointestinal motility. In: *Dukes' physiology of domestic animals*. Swenson, M.J. and Reece, W.O eds. Cornell University Press. Ithaca, New York, USA 336-348.
- Atlas, R.M., 1984. Diversity of microbial communities. In: *Advances in microbial ecology*. Marshall, K. C., ed. Plenum Press, New York, 7, 1-47.
- Auffret, A., Barry, J.L., Thibault, J.F., 1993. Effect of chemical treatments of sugar-beet fiber on their physicochemical properties and on their in vitro fermentation. *J Sci Food Agric* 61, 195-203.
- Bach Knudsen, K.E., Jensen, B.B., Hansen, I., 1993. Digestion of polysaccharides and other major components in the small and large intestine of pigs fed on diets consisting of oat fractions rich in beta-D-glucan. *Br J Nutr* 70, 537-556.
- Bach Knudsen, K.E., and Jorgensen, H., 2001. Intestinal degradation of dietary carbohydrates-from birth to maturity. In: *Digestive physiology of pigs*, Lindberg, J.E. and Ogle, B. eds. CABI publishing. Wallingford, 109-120.

- Balaji, R., Wright, K.J., Hill, C.M., Dritz, S.S., Knoppel, E.L., Minton, J.E., 2000. Acute phase responses of pigs challenged orally with *Salmonella* Typhimurium. *J Anim Sci* 78, 1885-1891.
- Banks, W., 1993. Applied veterinary histology, 3rd. ed. Harbound: Mosby.
- Baron, S.F., and Hylemon, P.B., 1997. Biotransformation of bile acids, cholesterol, and steroid hormones. In *Gastrointestinal Microbiology*. Mackie, R. I., White, B. A., and Isaacson, R. E. eds. Chapman and Hall, New York, 1, 470-510.
- Bauer, H., Paronetto, F., Burns, W.A., Einheber, A., 1966. The enhancing effect of the microbial flora on macrophage function and the immune response. A study in germfree mice. *J Exp Med* 123, 1013-1024.
- Baumann, D., Bilkei, G., 2002. Effect of highly fermentable dietary fiber on the development of swine dysentery and on pig performance in a "Pure--Culture Challenge Model". *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 115, 37-42.
- Bealmeear, P.M., 1980. Host defense mechanisms in gnotobiotic animals. In: *Immunologic defects in laboratory animals*, Gershwin, E., Marchant, B. eds Plenum Press, New York, 2, 261-350.
- Berends, B.R., Van Knapen, F., Mossel, D.A., Burt, S.A., Snijders, J.M., 1998. *Salmonella* spp on pork at cutting plants and at the retail level and the influence of particular risk factors. *Int J Food Microbiol* 44, 207-217.
- Berg, G., N. Roskot, A. Steidle, L. Eberl, A. Zock, and K. Smalla., 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3328–3338.
- Bergman, E.N., 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev* 70, 567-590.
- Bernalier, A., Dore, J., Durand, M., 1999. Biochemistry of fermentation. In: *Colonic microbiota, nutrition and health*. Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. eds Kluwer Academic Publishers., Dordrecht, the Netherlands, 37-53.
- Bhandari, S.K., Xu, B., Nyachoti, C.M., Giesting, D.W., Krause, D.O., 2008. Evaluation of alternatives to antibiotics using an *Escherichia coli* K88+ model of piglet diarrhea: effects on gut microbial ecology. *J Anim Sci* 86, 836-847.
- Björck, I., 1996. Starch: analitical aspects. In: *Carbohydrates in food*, Eliasson, AC Dekker, M. ed. New York, EEUU, 505-554.

- Botsoglou, N.A., Florou-Paneri, P., Christaki, E., Fletouris, D.J., Spais, A.B., 2002. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. *Br Poult Sci* 43, 223-230.
- Bovee-Oudenhoven, I.M., ten Bruggencate, S.J., Lettink-Wissink, M.L., van der Meer, R., 2003. Dietary fructo-oligosaccharides and lactulose inhibit intestinal colonisation but stimulate translocation of salmonella in rats. *Gut* 52, 1572-1578.
- Brown, I., Warhurst, M., Arcot, J., Playne, M., Illman, R.J., Topping, D. L., 1997. Fecal numbers of bifidobacteria are higher in pigs fed *Bifidobacterium longum* with a high amylose corn starch than with a low amylose corn starch. *J. Nutr* 127, 1822-1827.
- Brunsgaard, G., 1998. Effects of cereal type and feed particle size on morphological characteristics, epithelial cell proliferation, and lectin binding patterns in the large intestine of pigs. *J Anim Sci* 76, 2787-2798.
- Canibe, N., Jensen, B.B., 2003. Fermented and nonfermented liquid feed to growing pigs: effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance. *J Anim Sci* 81, 2019-2031.
- Canibe, N., Mikkelsen, L.L., Knarreborg, A., Pedersen, A.Ø., Maribo, H., Jensen, B.B., 2004. Organic acids and fermented liquid feed as alternatives to antibiotic growth promoters. In: International Invitational Symposium; Beyond antimicrobial growth promoters in food animal production, Tejle, Dinamarca, 135.
- Canibe, N., Hojberg, O., Hojsgaard, S., Jensen, B.B., 2005. Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs. *J Anim Sci* 83, 1287-1302.
- Cao, S.Y., Wang, M.S., Cheng, A.C., Qi, X.F., Yang, X.Y., Deng, S.X., Yin, N.C., Zhang, Z.H., Zhou, D.C., Zhu, D.K., Luo, Q.H., Chen, X.Y., 2008. Comparative analysis of intestinal microbial community diversity between healthy and orally infected ducklings with *Salmonella* Enteritidis by ERIC-PCR. *World J Gastroenterol* 14, 1120-1125.
- Castagliuolo, I., LaMont, J.T., Nikulasson, S.T., Pothoulakis, C., 1996. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. *Infect Immun* 64, 5225-5232.

- Castagliuolo, I., Riegler, M.F., Valenick, L., LaMont, J.T., Pothoulakis, C., 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect Immun* 67, 302-30.
- Castillo, M., Martin-Orue, S.M., Manzanilla, E.G., Badiola, I., Martin, M., Gasa, J., 2006a. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Vet Microbiol* 114, 165-170.
- Castillo, M., Martin-Orue, S.M., Roca, M., Manzanilla, E.G., Badiola, I., Perez, J.F., Gasa, J., 2006b. The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs. *J Anim Sci* 84, 2725-2734.
- Castillo, M., Martin-Orue, S.M., Nofrarias, M., Manzanilla, E.G., Gasa, J., 2007a, Changes in caecal microbiota and mucosal morphology of weaned pigs. *Vet Microbiol* 124, 239-247.
- Castillo, M., Skene, G., Roca, M., Anguita, M., Badiola, I., Duncan, S.H., Flint, H.J., Martin-Orue, S.M., 2007b. Application of 16S rRNA gene-targetted fluorescence in situ hybridization and restriction fragment length polymorphism to study porcine microbiota along the gastrointestinal tract in response to different sources of dietary fibre. *FEMS Microbiol Ecol* 59, 138-146.
- Cavaglieri, C.R., Martins, E.F., Colleone, V.V., Rodrigues, C., Vecchia, M.G., Curi, R., 2000. Fiber-rich diets alter rat intestinal leukocytes metabolism. *J Nutr Biochem* 11, 555-561.
- Chesson, A., 1994. Probiotics and other intestinal mediators. In: *Principles of Pig Science*. Cole, D.J.A., Wiseman, J. and Varley, M.A eds. Nottingham University Press, Nottingham, 197-214.
- Christensen, D.N., Bach Knudsen, K.E., Wolstrup, J., Jensen, B.B., 1999. Integration of ileum cannulated pigs and in vitro fermentation to quantify the effect of diet composition on the amount of short-chain fatty acids available from fermentation in the large intestine. *J. Sci. Food Agric.* 79: 755–762.
- Collier, C.T., Smiricky-Tjardes, M.R., Albin, D.M., Wubben, J.E., Gabert, V.M., Deplancke, B., Bane, D., Anderson, D.B., Gaskins, H.R., 2003. Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters. *J Anim Sci* 81, 3035-3045.
- Conway, P.L., 1994. Function and regulation of the gastrointestinal microbiota of the pig. *EAPP publication* 2, 231-240.

- Conway, P.L., 1995. Microbial ecology of the human large Intestine. In Human Colonic Bacteria. Gibson, G.R., Macfarlane, G.T. eds. Boca Raton, FL: CRC Press, USA, 1-24.
- Correa-Matos, N.J., Donovan, S.M., Isaacson, R.E., Gaskins, H.R., White, B.A., Tappenden, K.A., 2003. Fermentable fiber reduces recovery time and improves intestinal function in piglets following *Salmonella* Typhimurium infection. J Nutr 133, 1845-1852.
- Cromwell, G.L., 2002. Why and how antibiotics are used in swine production. Anim Biotechnol 13, 7-27.
- Crutsinger, G.M., Collins, M.D., Fordyce, J.A., Gompert, Z., Nice, C.C., Sanders, N.J., 2006. Plant genotypic diversity predicts community structure and governs an ecosystem process. Science 313, 966-968.
- Cullen, S., Monahan, F., O'Doherty, J., 2005. The effect of dietary garlic and rosemary on grower-finisher pig performance and sensory characteristics of porc. J Anim Sci 83, 29.
- Cummings, J.H., 1982. Polysaccharide fermentation in the human colon. In: Colon and nutrition. Falk Symposium 32, Kasper, H. and Goebell, H. eds. M.T.P. Press, Lancaster, UK, 91-103.
- Cummings, J.H. and Macfarlane, G.T., 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. J Appl Bacteriol 70, 443-459.
- Daly, K., Stewart, C.S., Flint, H.J., Shirazi-Beechey, S.P., 2001. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. FEMS Microbiol Ecol. 38, 141-151.
- de Blas, C., Mateos, G.G., Rebollar, P.G., 2003. Tablas de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos (2ª Edición) (Fedna).
- De Smet, I., De Boever, P., Verstraete, W., 1998. Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. Br J Nutr. 79, 185-194.
- Demigne, C.R., Morand, C., 1999. Short Chain Fatty Acids. In: Colonic microbiota, nutrition and health. Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. eds. Dordrecht, the Netherlands, 56-68.
- Deplancke, B., Hristova, K.R., Oakley, H.A., McCracken, V.J., Aminov, R., Mackie, R.I., Gaskins, H.R., 2000. Molecular ecological analysis of the succession and

- diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 66, 2166-2174.
- Dorman, H.J., and Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88, 308-316.
- Duncan, S.H., Scott, K.P., Ramsay, A.G., Harmsen, H.J., Welling, G.W., Stewart, C.S., Flint, H.J., 2003. Effects of alternative dietary substrates on competition between human colonic bacteria in an anaerobic fermentor system. *Appl Environ Microbiol* 69, 1136-1142.
- Durmic, Z., Pethick, D.W., Pluske, J.R., Hampson, D.J., 1998. Changes in bacterial populations in the colon of pigs fed different sources of dietary fibre, and the development of swine dysentery after experimental infection. *J Appl Microbiol* 85, 574-582.
- EFSA, 2006. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. *The EFSA Journal* 94.
- Ehle, F.R., and Warner, R.G., 1978. Nutritional implications of the hamster forestomach. *J Nutr* 108, 1047-1053.
- Englyst, H.N., Hay, S., Macfarlane, G.T., 1987. Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95, 163–171.
- Ewing, W.N., and Cole, D.J.A., 1994. The microbiology of the gastrointestinal tract. In: *The living gut. An introduction to microorganisms in nutrition.* Ewing W.N. and Cole, D. J. A. eds. Context Publications, Dungannon, Ireland, 45-65.
- FAO/WHO, 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.
http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf.
- Finegold, S.M., Sutter, V.L., Mathisen, G.E., 1983. Normal indigenous intestinal flora. In: *Human intestinal microflora in health and disease.* Hentges, D. J. eds. Academic Press, New York, 3-31.
- Fisher, S.G., and Lerman, L.S., 1979. Length independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16, 191-200.
- Flinchum, J.D., Nockles, C.F., Moreng, R.D., 1989. Aged hens fed zinc-methionine had chicks with improved performance. *Poult. Sci.* 68 (Suppl. 1):55. (Abstr.).

- Franco, L.D., Fondevila, M., Lobera, M.B., Castrillo, C., 2005. Effect of combinations of organic acids in weaned pig diets on microbial species of digestive tract contents and their response on digestibility. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 89, 88-93.
- Franks, A.H., Harmsen, H.J., Raangs, G.C., Jansen, G.J., Schut, F., Welling, G.W., 1998. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 64, 3336-3345.
- Fukushima, Y., Kawata, Y., Hara, H., Terada, A., Mitsuoka, T., 1998. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int J Food Microbiol* 42, 39-44.
- Fuller, R., 1977. The importance of Lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. *Br Poult Sci* 18, 85-94.
- Fuller, R., and Cole, C.B., 1988. The scientific basis of the probiotic concept. In *Probiotics- Theory and Applications*. Stark, B.A. and Wilkinson, J.M. eds. Chalcombe Publications, Marlow, 1-14.
- Galfi, P., and Bokori, J., 1990. Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. *Acta Veterinaria Hungarica* 38, 3-17.
- Gibson, G.R., and Wang, X., 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol* 77, 412-420.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125, 1401-1412.
- Gibson, G.R., 1999. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics Oligofructose and inulin. *J. Nutr*, 1438-1441.
- Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., Salminen, S., 1992. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 37, 121-128.
- Gong, J., Forster, R.J., Yu, H., Chambers, J.R., Sabour, P.M., Wheatcroft, R., Chen, S., 2002. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS Microbiol Lett* 208, 1-7.
- Gordon, H.A., Bruckner-Kardoss, E., Staley, T.E., Wagner, M., Wostmann, B.S., 1966. Characteristics of the germfree rat. *Acta Anatomica* 64, 367-379.

- Grieshop, C.M., Flickinger, E.A., Fahey, G.C., Jr., 2002. Oral administration of arabinogalactan affects immune status and fecal microbial populations in dogs. *J Nutr* 132, 478-482.
- Guerra, B., Soto, S., Helmuth, R., Mendoza, M.C., 2002. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 2977-2981.
- Hahn, J.D., Baker, D.H., 1993. Growth and plasma zinc responses of young pigs fed pharmacologic levels of zinc. *J Anim Sci* 71, 3020-3024.
- Hald, T., Vose, D., Wegener, H.C., Koupeev, T., 2004. A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. *Risk Anal* 24, 255-269.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 86, 985-990.
- Han, Y.M., Roneker, K.R., Pond, W.G., Lei, X.G., 1998. Adding wheat middlings, microbial phytase, and citric acid to corn-soybean meal diets for growing pigs may replace inorganic phosphorus supplementation. *J Anim Sci* 76, 2649-2656.
- Harmsen, H.J., Raangs, G.C., He, T., Degener, J.E., Welling, G.W., 2002. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 68, 2982-2990.
- Hayashi, H., Takahashi, R., Nishi, T., Sakamoto, M., Benno, Y., 2005. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol* 54, 1093-1101.
- Hedemann, M.S., Mikkelsen, L.L., Naughton, P.J., Jensen, B.B., 2005. Effect of feed particle size and feed processing on morphological characteristics in the small and large intestine of pigs and on adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT12 in the ileum in vitro. *J Anim Sci* 83, 1554-1562.
- Heise, E.R., Myrvik, Q., N., 1966. Levels of lysosomal hydrolases in alveolar and peritoneal macrophages from conventional and germ-free rats. *Fed. Proc.* 25:, 439.

- Hill, G.M., Cromwell, G.L., Crenshaw, T.D., Dove, C.R., Ewan, R.C., Knabe, D.A., Lewis, A.J., Libal, G.W., Mahan, D.C., Shurson, G.C., Southern, L.L., Veum, T.L., 2000. Growth promotion effects and plasma changes from feeding high dietary concentrations of zinc and copper to weanling pigs (regional study). *J Anim Sci* 78, 1010-1016.
- Hill, G.M., Mahan, D.C., Carter, S.D., Cromwell, G.L., Ewan, R.C., Harrold, R.L., Lewis, A.J., Miller, P.S., Shurson, G.C., Veum, T.L., 2001. Effect of pharmacological concentrations of zinc oxide with or without the inclusion of an antibacterial agent on nursery pig performance. *J Anim Sci* 79, 934-941.
- Hill, J.E., Hemmingsen, S.M., Goldade, B.G., Dumonceaux, T.J., Klassen, J., Zijlstra, R.T., Goh, S.H., Van Kessel, A.G., 2005. Comparison of ileum microflora of pigs fed corn-, wheat-, or barley-based diets by chaperonin-60 sequencing and quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* 71, 867-875.
- Högberg, A., J. E. Lindberg, T. Leser and P. Wallgren., 2004. Influence of cereal non-starch polysaccharides on ileo-caecal and rectal microbial populations in growing pigs. *Acta Vet. Scand.*45:87-98.
- Hojberg, O., Canibe, N., Poulsen, H.D., Hedemann, M.S., Jensen, B.B., 2005. Influence of dietary zinc oxide and copper sulfate on the gastrointestinal ecosystem in newly weaned piglets. *Appl Environ Microbiol* 71, 2267-2277.
- Hold, G.L., Pryde, S.E., Russell, V.J., Furrie, E., Flint, H.J., 2002. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 39, 33-39.
- Hsu, C.K., Liao, J.W., Chung, Y.C., Hsieh, C.P., Chan, Y.C., 2004. Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats. *J Nutr* 134, 1523-1528.
- Husebye, E., Hellstrom, P.M., Midtvedt, T., 1994. Intestinal microflora stimulates myoelectric activity of rat small intestine by promoting cyclic initiation and aboral propagation of migrating myoelectric complex. *Dig Dis Sci* 39, 946-956.
- Inoue, R., Tsukahara, T., Nakanishi, N., Ushida, K., 2005. Development of the intestinal microbiota in the piglet. *J Gen Appl Microbiol* 51, 257-265.
- Isaacson, R.E., Firkins, L.D., Weigel, R.M., Zuckermann, F.A., DiPietro, J.A., 1999. Effect of transportation and feed withdrawal on shedding of *Salmonella* Typhimurium among experimentally infected pigs. *Am J Vet Res* 60, 1155-1158.

- Jamroz, D. and Kamel, C., 2002. Plant extracts enhance broiler performance. *J Anim Sci* 80, 41.
- Jensen, B.B., and Jorgensen, H., 1994. Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs. *Appl Environ Microbiol* 60, 1897-1904.
- Jensen, B.B., 1998. The impact of feed additives on the microbiological ecology of the gut in young pigs. *J. Anim. Feed Sci.* 7, 45–64.
- Jensen, B.B., 2001. Possible ways of modifying type and amount of products from microbial fermentation in the gut. In: Gut environment of pigs. Piva, A., Bach Knudsen, K. E. and Lindberg J. E., eds. Nottingham University Press, United Kingdom, 181-200.
- Jiang, T., and Savaiano, D.A., 1997. Modification of colonic fermentation by bifidobacteria and pH in vitro. Impact on lactose metabolism, short-chain fatty acid, and lactate production. *Dig Dis Sci* 42, 2370-2377.
- Jin, L.Z., Marquardt, R.R., Zhao, X., 2000. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Appl Environ Microbiol* 66, 4200-4204.
- Kamel, C., 2001. Tracing modes of action and the roles of plant extracts in non-ruminants. In: Recent advances in animal nutrition. Garnsworthy, P.C. and Wiseman, J. ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK, 135-150.
- Kass, M.L., Van Soest, P.J., Pond, W.G., 1980. Utilization of dietary fiber from alfalfa by growing swine. *J Anim Sci* 2, 192-197.
- Katouli, M., Lund, A., Wallgren, P., Kuhn, I., Soderlind, O., Mollby, R., 1997. Metabolic fingerprinting and fermentative capacity of the intestinal flora of pigs during pre- and post-weaning periods. *J Appl Microbiol* 83, 147-154.
- Katouli, M., Melin, L., Jensen-Waern, M., Wallgren, P., Mollby, R., 1999. The effect of zinc oxide supplementation on the stability of the intestinal flora with special reference to composition of coliforms in weaned pigs. *J Appl Microbiol* 87, 564-573.
- Kaufmann, L. and Rousseeuw, P.J., 1990. Finding groups in data. An introduction to cluster analysis. Wiley J and sons, Inc., New York.
- Kenworthy, R., 1970. Effect of *Escherichia coli* on germ-free and gnotobiotic pigs. I. Light and electron microscopy of the small intestine. *J Comp Pathol* 80, 53-63.

- Key, F.B., Mathers, J.C., 1995. Digestive adaptations of rats given white bread and cooked haricot beans (*Phaseolus vulgaris*): large-bowel fermentation and digestion of complex carbohydrates. *Br J Nutr* 74, 393-406.
- Konstantinov, S.R., Zhu, W.-Y., Williams, B.A., Tamminga, S., Vos, W.M., Akkermans, A.D., 2003. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16 ribosomal DNA. *FEMS Microbiol Ecol* 43, 225-235.
- Konstantinov, S.R., Awati, A., Smidt, H., Williams, B.A., Akkermans, A.D., de Vos, W.M., 2004. Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus*-like phylotype to dietary prebiotics in the guts of weaning piglets. *Appl Environ Microbiol* 70, 3821-3830.
- Konstantinov, S.R., Awati, A.A., Williams, B.A., Miller, B.G., Jones, P., Stokes, C.R., Akkermans, A.D., Smidt, H., de Vos, W.M., 2006. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environ Microbiol* 8, 1191-1199.
- Kowarz, M., Lettner, F., Zollitsch, W., 1994. Use of a microbial growth promotor in feeding sows and piglets. *Bodenkultur*. 45:85 (abs).
- Kulkarni, A.D., Fanslow, W.C., Drath, D.B., Rudolph, F.B., Van Buren, C.T., 1986. Influence of dietary nucleotide restriction on bacterial sepsis and phagocytic cell function in mice. *Arch Surg* 121, 169-172.
- Kumprecht, I. and Zobac, P., 1998. The role of intestinal microflora in animal nutrition. In: *Microbes and Biological Productivity*, Society for General Microbiol. Symposium 21. Hughes, D. E and Rose, A. H. eds. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kyriakis, S.C., Tsiloyiannis, V.K., Vlemmas, J., Sarris, K., Tsinas, A.C., Alexopoulos, C., Jansegers, L., 1999. The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. *Res Vet Sci* 67, 223-228.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. eds. John Wiley and Sons, Chichester, New York.
- Langendijk, P.S., Schut, F., Jansen, G.J., Raangs, G.C., Kamphuis, G.R., Wilkinson, M.H., Welling, G.W., 1995. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 61, 3069-3075.

- Langhout, P., 2000. New additives for broiler chickens. *World poultry* 16, 22-27.
- Lee, H.S., and Ahn, Y.J., 1998, Growth-Inhibiting Effects of *Cinnamomum cassia* Bark-Derived Materials on Human Intestinal Bacteria. *J Agric Food Chem* 46, 8-12.
- Lee, Y.K., Nomoto, K., Salminen, S., Gorbach, S.L., 1999. *Handbook of Probiotics*. New York. Wiley, J., and Sons, Inc.
- Leser, T.D., Lindecrona, R.H., Jensen, T.K., Jensen, B.B., Moller, K., 2000. Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Appl Environ Microbiol* 66, 3290-3296.
- Leser, T.D., Amenuvor, J.Z., Jensen, T.K., Lindecrona, R.H., Boye, M., Moller, K., 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microbiol* 68, 673-690.
- Lim, B.O., Yamada, K., Nonaka, M., Kuramoto, Y., Hung, P., Sugano, M., 1997. Dietary fibers modulate indices of intestinal immune function in rats. *J Nutr* 127, 663-667.
- Lin, H.C., and Visek, W.J., 1991. Colon mucosal cell damage by ammonia in rats. *J Nutr* 121, 887-893.
- Lindecrona, R.H., Jensen, B.B., Leser, T., Jiufeng, W., Moller, K., 2003. The influence of diet on the development of swine dysentery upon experimental infection. *Anim Sci*, 81-87.
- Lueck, E. 1980. *Antimicrobial Food Additives: Characteristics, uses, effects*. Springer-Verlag Germany.
- Lynch, M.B., Sweeney, T., Callana, J.J., O'Doherty, J.V., 2007. The effect of dietary crude protein concentration and inulin supplementation on nitrogen excretion and intestinal microflora from finisher pigs. *Livest. Prod. Sci.* 109, 204-207.
- MacDonald, T.T., and Carter, P.B., 1978. Contact sensitivity in the germ-free mouse. *J Reticuloendothel Soc* 24, 287-293.
- Macfarlane, G.T., Gibson, G.R., Beatty, E., Cummings, J.H., 1992. Estimation of short-chain fatty acid production from protein by human intestinal bacteria based on branched-chain fatty acid measurements. *FEMS Microbiol. Ecol.* 161, 81-88.

- Macfarlane, S. and Macfarlane, G.T., 1995. Proteolysis and amino acid fermentation. In: Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology. Gibson, G. R. and MacFarlane, G.T., eds. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Mackie, R.I., Sghir, A., Gaskins, H.R., 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 69, 1035S-1045S.
- Makkar, H.P., and Becker, K., 1999. Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. *Br J Nutr* 81, 107-112.
- Manzanilla, E.G., Perez, J.F., Martin, M., Kamel, C., Baucells, F., Gasa, J., 2004. Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *J Anim Sci* 82, 3210-3218.
- Manzanilla, E.G., Nofrarias, M., Anguita, M., Castillo, M., Perez, J.F., Martin-Orue, S.M., Kamel, C., Gasa, J., 2006. Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *J Anim Sci* 84, 2743-2751.
- Martinez-Puig, D., Perez, J.F., Castillo, M., Andaluz, A., Anguita, M., Morales, J., Gasa, J., 2003. Consumption of raw potato starch increases colon length and fecal excretion of purine bases in growing pigs. *J Nutr* 133, 134-139.
- Mathew, A.G., Chattin, S.E., Robbins, C.M., Golden, D.A., 1998. Effects of a direct-fed yeast culture on enteric microbial populations, fermentation acids, and performance of weanling pigs. *J Anim Sci* 76, 2138-2145.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Oyaizu, H., Tanaka, R., 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 68, 5445-5451.
- Maxwell, C.V., and S.D. Carter. 2001. Feeding the weaned pig. In: *Swine Nutrition*. Lewis, A.J. and Southern L.L eds., CRC Press, Boca Raton, FL.
- McBurney, M.I., Horvath, P.J., Jeraci, J.L., Van Soest, P.J., 1985. Effect of in vitro fermentation using human faecal inoculum on the water-holding capacity of dietary fibre. *Br J Nutr* 53, 17-24.
- McCracken, V.J., and Gaskins, H.R., 1999. Probiotics and the immune system. In *Probiotics a critical review*. Tannock, G.W. ed. Horizon Scientific Press, Norfolk, England, 85-111.

- McCracken, V.J., Simpson, J.M., Mackie, R.I., Gaskins, H.R., 2001. Molecular ecological analysis of dietary and antibiotic-induced alterations of the mouse intestinal microbiota. *J Nutr* 131, 1862-1870.
- McCullogh, J.S., Ratcliffe, B., Mandir, N., Carr, K.E., Goodlad, R.A., 1998. Dietary fibre and intestinal microflora: effects on intestinal morphometry and crypt branching. *Gut* 42, 799-806.
- Melin, L., 2001. Weaning of pigs with special focus on the intestinal health. Doctoral thesis. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae Veterinaria*. Swedish University of Agricultural Sciences. Sweden.
- Metchnikoff, E. 1908. *The prolongation of life*. Putmans, G. P. ed. G. Putmans Sons, New York.
- Meunier-Salaun, M.C., Edwards, S.A., Robert, S., 2001. Effect of dietary fibre on the behaviour and health of the restricted fed sow. *Anim. Feed Sci. Technol* 90, 53-69.
- Mikkelsen, L.L., Naughton, P.J., Hedemann, M.S., Jensen, B.B., 2004. Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 70, 3485-3492.
- Montagne, L., Pluske, J.R., Hampson, D.J., 2003. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young and non-ruminant animals. *Anim. Feed Sci. Tech.* 108 95-117.
- Moore, W.E., and Holdeman, L.V., 1974. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol* 27, 961-979.
- Moore, W.E., Moore, L.V., Cato, E.P., Wilkins, T.D., Kornegay, E.T., 1987. Effect of high-fiber and high-oil diets on the fecal flora of swine. *Appl Environ Microbiol* 53, 1638-1644.
- Morales, J., Perez, J.F., Martin-Orue, S.M., Fondevila, M., Gasa, J., 2002. Large bowel fermentation of maize or sorghum-acorn diets fed as a different source of carbohydrates to Landrace and Iberian pigs. *Br J Nutr* 88, 489-498.

- Mores, N., Christani, J., Piffer, I.A., Barioni, W., Lima, J., and G. M. M., 1998. Efeito do oxido de zinco no controle da diarreia pos-desmame em leitões infectados experimentalmente com *Escherichia coli* (Effects of zinc oxide on postweaning diarrhea control in pigs experimentally infected with *E. coli*). Arq. Brasil. Med. Vet. Zootec. 50, 513–523.
- Moter, A., and Gobel, U.B., 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J Microbiol Methods 41, 85-112.
- Murphy, A.M., Waits, P.L., Kendall, C.K., Wasser, K.S., Higbee, A.J., Bogden, R., 2002. An evaluation of long-term preservation methods for brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA samples. Conserv Genet, 435-440.
- Namkung, H., Li, M., Yu, H., Cottrill, M., Gong, J., deLange, C.F.M., 2003. Impact of feeding blends of organic acids or herbal extracts on growth performance, gut microflora and digestive function in newly weaned pigs. In: 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs., Canada. Vol 2, 93-95.
- Nofrarías, M., 2007. Efecte de diferents components de la dieta sobre l'estructura i sistema immunitari intestinals en el porc. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Nyachoti, C.M., Omogbenigun, F.O., Rademacher, M., Blank, G., 2006. Performance responses and indicators of gastrointestinal health in early-weaned pigs fed low protein amino acid-supplemented diets. J Anim Sci 84, 125-134.
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R., Stahl, D.A., 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. Annu Rev Microbiol 40, 337-365.
- Osterberg, J., Wallgren, P., 2008. Effects of a challenge dose of *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Yoruba on the patterns of excretion and antibody responses of pigs. Vet Rec 162, 580-585.
- Partanen, H.K., and Mroz, Z., 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. Nutr Res Rev 12, 117-145.
- Partanen, K., 2001 Organic acids- their efficacy and modes of action in pigs. In: Gut environment of pigs. Piva, A., Bach Knudsen, K. E. and Lindberg, J. E. eds. Nottingham University Press, Nottingham, UK., 201-217.
- Partridge, G.G., 2001. The role and efficacy of carbohydrase enzymes in pig nutrition. In: Enzymes in farm animal nutrition. Bedford, M.R., and Partridge, G. eds. Marlborough, Wiltshire, UK, 161-198.

- Paulicks, B.R., Roth F. X., Kirchgessner, M., 1996. Dose effects of potassium diformate (Formi LHS) on the performance of growing piglets. *Agribiol. Res* 49, 318-326.
- Pérez, J.F., and Gasa, J., 2002. Importancia de los carbohidratos de la dieta y de la utilización de aditivos sobre la salud intestinal en el ganado porcino. XVIII Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación Animal. 53-70.
- Pfost, H., Headley, V., 1976. Methods of determining and expressing particle size. In: H. Pfost (ed), *Feed Manufacturing Technology II - Appendix C*. Am. Feed Manufacturers Assoc., Arlington, VA.
- Piva, A., Panciroli, A., Meola, E., Formigoni, A., 1996. Lactitol enhances short-chain fatty acid and gas production by swine cecal microflora to a greater extent when fermenting low rather than high fiber diets. *J Nutr* 126, 280-289.
- Pluske, J.R., Siba, P.M., Pethick, D.W., Durmic, Z., Mullan, B.P., Hampson, D.J., 1996. The incidence of swine dysentery in pigs can be reduced by feeding diets that limit the amount of fermentable substrate entering the large intestine. *J Nutr* 126, 2920-2933.
- Pluske, J.R., Durmic, Z., Pethick, D.W., Mullan, B.P., Hampson, D.J., 1998. Confirmation of the role of rapidly fermentable carbohydrates in the expression of swine dysentery in pigs after experimental infection. *J Nutr* 128, 1737-1744.
- Pluske, J.R., and Pethick, D.W., 1999. Non-starch polysaccharides in pig diets and their influence on intestinal microflora, digestive physiology and enteric disease. In: *Recent Advances in Animal Nutrition*. Garnsworthy, P. C. and Wiseman, J. ed. Nottingham Univ. Press, Loughborough, U.K. 189-226.
- Pothoulakis, C., Kelly, C.P., Joshi, M.A., Gao, N., O'Keane, C.J., Castagliuolo, I., Lamont, J.T., 1993. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology* 104, 1108-1115.
- Pryde, S.E., Richardson, A.J., Stewart, C.S., Flint, H.J., 1999. Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and cecal lumen of a pig. *Appl Environ Microbiol* 65, 5372-5377.
- Ramakrishna, B., Venkataraman, S., Srinivasanm, P., Dash, P., Young, G., Binder, H., 2000. Amylase-resistant starch plus oral rehydration solution for cholera. *The N Engl J Med* 342, 308-313.

- Risley, C.R., Kornegay, E.T., Lindemann, M.D., Weakland, S.M., 1991. Effects of organic acids with or without a microbial culture on the performance and gastrointestinal tract measurements of weanling pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 35, 259-270.
- Robinson, I.M., Allison, M.J., Bucklin, J.A., 1981. Characterization of the cecal bacteria of normal pigs. *Appl Environ Microbiol* 41, 950-955.
- Robinson, I.M., Whipp, S.C., Bucklin, J.A., Allison, M.J., 1984. Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs. *Appl Environ Microbiol* 48, 964-969.
- Roediger, W.E., 1980. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* 21, 793-798.
- Rolfe, R.D., 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr* 130, 396S-402S.
- Rothkötter, H.J., Möllhoff, S., Pabst, R., 1999. The influence of age and breeding conditions on the number and proliferation of intraepithelial lymphocytes in pigs. *Scand. J. Immunol.* 50, 31-38.
- Rueda, R., Gomez-Leon, C., Gil, A., 2002. Ribonucleic acid hydrolysis by intestinal explants of neonatal piglets. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35, 685-690.
- Russell, J.B., and Diez-Gonzalez, F., 1998. The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Adv Microb Physiol* 39, 205-234.
- Saavedra, J.M., Bauman, N.A., Oung, I., Perman, J.A., Yolken, R.H., 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 344, 1046-1049.
- Sakagami, Y., Murata, H., Tsutomu, N., Inatomi, Y., Watabe, K., Inuma, M., Tanaka, T., Murata, J., Lang, F.A., 2001. Inhibitory effect of plant extracts on production of verotoxin by enterohemorrhagic escherichia coli O157:H7. *J Health Sci* 47, 473-477.
- Salyers, A.A., 1979. Energy sources of major intestinal fermentative anaerobes. *Am J Clin Nutr* 32, 158-163.
- Sangild, P.T., Nielsen, T.T., Cirera, S., Fredholm, M., Canibe, N., Troelsen, J., Olsen, J., 2003. Effects of a high-fat, low-fiber diet on gut growth, function and microbiology in aged sows. In: 9th International symposium on digestive physiology in pigs., Banff, Canada, 81.

- Savage, D.C., 1986. Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. *Annu Rev Nutr* 6, 155-178.
- Savage, D.C., 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 31, 107-133.
- Savage, D.C., 1999. Mucosal Microbiota. In *Mucosal Immunology*. Orga. P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J.R., eds. San Diego, CA: Academic Press; 19-30.
- Schrezenmeir, J., and de Vrese, M., 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 73, Suppl. 2, 361s–364s.
- Schwartz, K.J., 1999. Diseases of swine, Vol 39. Iowa state university press., Ames, Iowa U.S.A, 535-551.
- Selim, A.S., Boonkumklao, P., Sone, T., Assavanig, A., Wada, M., Yokota, A., 2005. Development and assessment of a real-time pcr assay for rapid and sensitive detection of a novel thermotolerant bacterium, *Lactobacillus thermotolerans*, in chicken feces. *Appl Environ Microbiol* 71, 4214-4219.
- Shannon, C.E., and Weaver, W., 1963. The Mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana/Chicago, IL.
- Simpson, J.M., McCracken, V.J., White, B.A., Gaskins, H.R., Mackie, R.I., 1999. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J Microbiol Methods* 36, 167-179.
- Simpson, J.M., Martineau, B., Jones, W.E., Ballam, J.M., Mackie, R.I., 2002. Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microb Ecol* 44, 186-197.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol* 26, 118-122.
- Stewart, C.S., 1997, Microorganisms in hindgut fermentors. In: *Gastrointestinal Microbiology*. Mackie, R. I., and White, B. A. eds. Chapman and Hall Microbiology series, New York, Vol 2, 142-186.
- Stewart, C.S., and Chesson, A., 1993. Making sense of probiotics. *Pig Vet J* 31, 11–33.

- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., Dore, J., 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 65, 4799-4807.
- Suhr, K.I., Nielsen, P.V., 2003. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *J Appl Microbiol* 94, 665-674.
- Swords, W.E., Wu, C.C., Champlin, F.R., Buddington, R.K., 1993. Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora. *Biol Neonate* 63, 191-200.
- Tabeling, R., Schwier, S., Kamphues, J., 2003. Effects of different feeding and housing conditions on dry matter content and consistency of faeces in sows. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 87, 116-121.
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Benno, Y., 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 67, 2766-2774.
- Tannock, G.W., Fuller, R., Pedersen, K., 1990. *Lactobacillus* succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling. *Appl Environ Microbiol* 56, 1310-1316.
- Tannock, G.W., 1999. Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics. In: *Gastrointestinal Microbiol.*, Vol 2. Chapman and Hall Microbiol. Series, New York, 434-455.
- Tappenden, K.A., Thomson, A.B., Wild, G.E., McBurney, M.I., 1997. Short-chain fatty acid-supplemented total parenteral nutrition enhances functional adaptation to intestinal resection in rats. *Gastroenterology* 112, 792-802.
- Tedesco, D., Galletti, S., Turini, J., Stella, S., , 2005. Effects of new natural feed additives on growth and intestinal microflora of weanling piglets (abs). *Ital. J. Anim. Sci.* 4, 494.
- Toride, Y., Srinongkote, S., Onishi, N., 1998. Effect of digested bacterial cell powder (DBCP) on performance of postweaning and suckling piglets. *Anim Sci Technol* 69, 8-13.
- Torrallardona, D., Badiola, I., Brozc, J., 2007. Effects of benzoic acid on performance and ecology of gastrointestinal microbiota in weanling piglets. *Livest Sci* 108, 210-213.

- Trowell, H., Southgate, D.A.T., Wolever, T.M.S., Leeds, A.R., Gassull, M.A., Jenkins, D.J.A., 1976, Dietary fibre redefined, Vol 1. The Lancet, 967.
- Uauy, R., Quan, R., Gil, A., 1994. Role of nucleotides in intestinal development and repair: implications for infant nutrition. *J Nutr* 124, 1436S-1441S.
- Van Winsen, R.L., B.A. Urlings, L. J. A. Lipman, J.M.A. Snijders, D. Keuzenkamp, J.H.M. Verheijden, Knapen., F.v., 2001. Effect of Fermented Feed on the Microbial Population of the Gastrointestinal Tracts of Pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3071-3076.
- van Elsas, J. D., P. Garbeva, and J. Salles., 2002. Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Biodegradation* 13, 29–40.
- Varel, V.H., Fryda, S.J., Robinson, I.M., 1984. Cellulolytic bacteria from pig large intestine. *Appl Environ Microbiol* 47, 219-221.
- Velazquez, G., Borbolla, A.G., Mariscal-Landin, G., Reis de Souza, T., Pinelli, A., 2005. Effect of oregan, cinnamon and chili pepper herbal extracts as growth promoters on growth performance of young pigs. *J Anim Sci* 83, 28.
- Veum, T.L., 1991. Feeding Neonatal Pigs. In: *Swine Nutrition*. Butterworthheinemann. Cahp. 29, 483-495.
- Vieira-Pinto, M., Temudo, P., Martins, C., 2005. Occurrence of salmonella in the ileum, ileocolic lymph nodes, tonsils, mandibular lymph nodes and carcasses of pigs slaughtered for consumption. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52, 476-481.
- Wallgren, P., and Melin, L., 2001. Weaning systems in the relation to disease, CABI Publishing Edition. The weaner pig, Nottingham UK, 309-324.
- Wang, X., Heazlewood, S.P., Krause, D.O., Florin, T.H., 2003. Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *J Appl Microbiol* 95, 508-520.
- Williams, J.L., Minton, J.E., Patterson, J.A., Marchant Forde, J., Eicher, S.D., 2008. Lairage during transport of 18-kg pigs has an impact on innate immunity and commensal bacteria diversity in intestines. *J Anim Sci* 86 (5):1232-1244.
- Wood, R.L., Pospischil, A., Rose, R., 1989. Distribution of persistent *Salmonella* Typhimurium infection in internal organs of swine. *Am J Vet Res* 50, 1015-1021.

- Woolverton, C.J., Holt, L.C., Mitchell, D., Sartor, R.B., 1992. Identification and characterization of rat intestinal lamina propria cells: consequences of microbial colonization. *Vet Immunol Immunopathol* 34, 127-138.
- Wostmann, B.S., 1961. Recent studies on the serum proteins of germfree animals. *Ann N Y Acad Sci* 94, 272-283.
- Wostmann, B.S., 1996. Germfree and gnotobiotic animal models: background and applications. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Yamada, H., Itoh, K., Morichita, Y., Taniguchi, H., 1993. Advances in cereal chemistry and technology in Japan. Structure and properties of oligomers from wheat bran. *Cereal Foods World* 35, 492-499.
- Yu, C.Y., Chou, S.J., Yeh, C.M., Chao, M.R., Huang, K.C., Chang, Y.F., Chiou, C.S., Weill, F.X., Chiu, C.H., Chu, C.H., Chu, C., 2008. Prevalence and characterization of multidrug-resistant (type ACSSuT) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains in isolates from four gosling farms and a hatchery farm. *J Clin Microbiol* 46, 522-526.
- Zinn, R.A., Owens, F.N., 1986. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. *J. Anim. Sci.* 66, 157-166.
- Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D., De Vos, W.M., 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 64, 3854-3859.
- Zoetendal, E.G., Collier, C.T., Koike, S., Mackie, R.I., Gaskins, H.R., 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr* 134, 465-472

Facultat de veterinària de Barcelona
Universitat Autònoma de Barcelona

