ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA

"IDENTIFICACIÓN DE *Lactobacillus* Y LEVADURAS AISLADAS DE EXCRETAS FERMENTADAS DE AVES CON POTENCIALIDADES PROBIÓTICAS"

TESIS DE GRADO

Previa la obtención del título de:
INGENIERO ZOOTECNISTA

AUTOR

MAURICIO XAVIER SALAS RUEDA

Riobamba – Ecuador

2009

Esta Tesis fue aprobada por el siguiente Tribunal

_____

Ing. M.C. José Maria Pazmiño Guadalupe.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

_____

Ing. M.C. Byron Leoncio Díaz Monroy.

DIRECTOR DE TESIS

_____

Dra. M.C. Sonia Elisa Peñafiel Acosta.

ASESOR DE TESIS

Riobamba, 13 de Abril del 2009

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación esta dedicado a toda mi familia, quienes sembraron en mí cada día, muchos valores que han marcado positivamente mi vida y que hoy estos valores sumados al esfuerzo conjunto, ya da su primer logro, a mi madre Gladys por que usted a sido mi fortaleza en todas mis aventuras, en todos mis proyectos y ahora en mi logro, a mi padre Bolívar, mis hermanos Bolívar y Fabián por ser soporte en muchas etapas de este camino, por todo esto y mucho más GRACIAS.

También quiero dedicar este trabajo a mis amigos Carmita, Carlos, César, Darío, Danilo, Jaime, José Antonio, José Luis, Milton, Pablo, Rodrigo y Sandra. Quiero recordarles mis palabras de alguna vez “Pues es tan difícil reconocer que el tiempo se nos viene encima y una etapa de la vida se acaba, pero la amistad perdura y los buenos momentos se guardan y se atesoran como la riqueza mas grande que lleva la existencia del hombre simplemente recuerden que lo mas fuerte que nos une es nuestra amistad”.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres por todo el apoyo que brindaron en mi vida universitaria en lo moral y económico, gracias por el sacrificio, esmero y dedicación que hicieron para que logre obtener un título universitario.

Agradezco de manera especial a la Ing. M. Cs. Yaneysi Garcia Hernandez. Científica-Investigadora del Instituto de Ciencia Animal (La Habana-Cuba), por haber sido mi tutor y guía en la elaboración de este trabajo investigativo.

Agradezco especialmente al Ing. Byron Díaz y Dra. Sonia Peñafiel por creer en este trabajo de investigación y con su conocimiento apoyar con el desarrollo del mismo.

Agradezco a Odalis y otros técnicos del Instituto de Ciencia Animal de Cuba, que me colaboraron de una u otra forma en esta investigación, para que se realice de la mejor manera posible.

Agradezco Carlos, Francisco, por me brindaron su voz de aliento en momentos duros para continuar la investigación a pesar de las pequeñas vicisitudes que se presentaron en el camino. GRACIAS AMIGOS.

MAURICIO XAVIER SALAS RUEDA.

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	v
Abstract	vi
Lista de Cuadros	vii
Lista de Gráficos	viii
Lista de Anexos	ix
I. INTRODUCCIÓN	**1**
II. REVISIÓN DE LITERATURA	**3**
A. MICROBIOTA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE LAS AVES	**3**
1. Composición de la Microbiota Gastrointestinal de las Aves	**4**
B. RESIDUALES AVÍCOLAS. CONCEPTO	**5**
1. Disponibilidad de los Residuales Avícolas	**5**
2. Valor Nutritivo y Aplicaciones de las Excretas de Aves	**6**
3. Excretas Fermentadas	**8**
C. PROBIÓTICOS	**9**
1. Modo de Acción de los Probióticos	**10**
2. Microorganismos Empleados como Probióticos	**12**
a. *Lactobacillus*	**13**
b. Levaduras	**13**
D. CARACTERIZACIÓN DE *LACTOBACILLUS* Y LEVADURAS	**14**
III. MATERIALES Y MÉTODOS	**16**
A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO	**16**
B. UNIDADES EXPERIMENTALES	**16**
1. Recolección de Excretas	**16**

2. Aislamiento de Microorganismos **16**

3. Identificación de Microorganismos **16**

C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES **17**

D. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL **17**

E. MEDICIONES EXPERIMENTALES **18**

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA **18**

G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL **18**

1. Aislamiento **18**

a. Muestreo de Excretas **18**

b. Proceso de Fermentación de las Excretas **19**

c. Medios de Cultivo y Conservación **20**

d. Método de Aislamiento y Conservación de los Aislados **20**

2. Identificación de los Microorganismos **20**

a. *Lactobacillus* **20**

(1) Características Culturales **20**

(2) Tinción de Gram **21**

(3) Catalasa **21**

(4) Crecimiento a Diferentes Temperaturas en un Medio Líquido **21**

(5) Fermentación de Azúcares **22**

b. Levaduras **23**

(1) Características Culturales **23**

(2) Tinción Gram **24**

(3) Morfología **24**

(4) Utilización de Urea **24**

(5) Presión Osmótica **24**

(6) Fermentación de Azúcares 24

(7) Asimilación de Azúcares 26

H. METODOLOGÍA DE LA EVALUACIÓN 26

1. Aislamiento de las Cepas 26

2. Identificación de *Lactobacillus* 26

3. Identificación de Levaduras 26

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 27

A. AISLAMIENTO DE LAS CEPAS 27

B. IDENTIFICACIÓN DE *LACTOBACILLUS* 27

1. Características Culturales 27

2. Tinción de Gram 27

3. Catalasa 29

4. Crecimiento a Diferentes Temperaturas en un Medio Líquido 29

5. Fermentación de Azúcares 29

C. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS 38

1. Características Culturales 38

2. Tinción de Gram 38

3. Morfología 40

4. Utilización de Urea 40

5. Presión Osmótica 40

6. Fermentación de Azúcares 40

7. Asimilación de Azúcares 40

D. BANCO DE GERMOPLASMA 47

V. CONCLUSIONES 49

VI. RECOMENDACIONES 50

VII. LITERATUTA CITADA **51**

ANEXOS **60**

LISTA DE CUADROS

Nº		Pág.
1	VALOR NUTRITIVO EN BASE SECA DE DIFERENTES EXCRETAS.	8
2	MODO DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS.	11
3	ESPECIES DE MICROORGANISMOS COMÚNMENTE USADAS COMO PROBIÓTICOS.	12
4	DIETA DE REMPLAZO EN PONEDORAS Y APORTES NUTRICIONALES.	19
5	CARACTERÍSTICAS CULTURALES DE LA IDENTIFICACIÓN DE *LACTOBACILLUS.*	28
6	COMPORTAMIENTO DEL CRECIMIENTO DE *LACTOBACILLUS SP* A DISTINTAS TEMPERATURAS.	33
7	CRECIMIENTO DE *LACTOBACILLUS SP* A 15 ºC Y 45 ºC.	34
8	RESULTADOS FERMENTACIÓN DE AZÚCARES CEPA 2 Y 3 MRS (TEST API 50 CHL A 24 Y 48 HORAS).	35
9	CARACTERÍSTICAS CULTURALES DE LA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS.	39
10	RESULTADOS FERMENTACIÓN DE AZÚCARES CEPA 3 AGAR MALTA (TEST API 20C AUX A 24 Y 48 HORAS).	43

LISTA DE GRÁFICOS

Nº		Pág.
1	Tracto gastrointestinal de las aves.	3
2	Cepa 1, catalasa (+), indica la formación de burbujas.	30
3	Cepa 2, catalasa (–), sin formación de burbujas.	31
4	Cepa 3, catalasa (–), sin formación de burbujas.	32
5	Formación de Seudomicelios cepa 3 Agar Malta (levaduras).	41
6	Crecimiento de la cepa 3 Agar Malta en el medio Presión Osmótica.	42
7	Fermentación de Azúcares cepa 3 Agar Malta (test api 20C aux).	44
8	Criptococosis a la piel.	46

LISTA DE ANEXOS

Nº	
1	Proceso de fermentación de las excretas de aves (White Legorhn).
2	Cepas de microorganismos aislados, medio de selección Agar Malta.
3	Cepa de *Lactobacillus acidophillus* (cepa 3) y *Lactobacillus plantarum* (cepa 2), en aislados puros.
4	*Lactobacillus plantarum*, al microscopio con el objetivo 40x, para observación de Tinción Gram.
5	*Lactobacillus acidophillus*, al microscopio con el objetivo 40x, para observación de Tinción Gram.
6	Cepa 3 de Levadura, en aislado puro.
7	Cepa 3 de Levadura en aislado puro, frente a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y cepa de *Candida sp.*
8	Cepa 3 de Levadura vista al microscopio con aceite de cedro y el objetivo 40x.
9	Cepa 3 de Levadura vista al microscopio para Tinción de Gram y el objetivo 40x.
10	Cepa 3 de Levadura vista al microscopio para identificar, ascosporas, clamidosporas, micelios y seudomicelios, con el objetivo 40x.
11	Cepa 3 de Levadura vista al microscopio identificando seudomicelios, con el objetivo 100x.

RESUMEN

En el Instituto de Ciencia Animal, en la Habana-Cuba, se identificó *lactobacillus* y levaduras provenientes de aislados a partir de la fermentación de excretas de aves de postura, las mismas que tienen un potencial probiótico. El experimento tuvo una duración de 120 días, los mismos que sirvieron para realizar los procesos de Recolección de Excretas, Aislamiento de Microorganismos e Identificación de *Lactobacillus* y Levaduras, usando como metodología criterios de identificación basados en la morfología y bioquímica de los microorganismos. Entre los principales resultados se reporta que se aislaron 3 tipos de colonias a partir del cultivo MRS y 6 tipos de colonias a partir del cultivo Agar Extracto de Malta. De las colonias aisladas del cultivo MRS se identifico a la Cepa 2 MRS como un *Lactobacillus plantarum* y a la Cepa 3 MRS como un *Lactobacillus acidophilus* por cumplir con las características que indican los criterios de identificación, como son básicamente bacterias de forma bacilar, gram (+), catalasa (-), y sus diferencias están en el crecimiento en distintas Tº y el perfil bioquímico de cada una de las especies además de tener un potencial probiótico comprobado. De las colonias aisladas del cultivo Agar Extracto de Malta no se logro realizar una identificación precisa, por que la Cepa 3 AM presenta un comportamiento no conocido en la literatura y en los criterios de identificación, se presume que es un nuevo género de levadura o al menos una nueva especie de géneros Trichosporom o Cryptococcus, asociados a enfermedades en seres humanos.

ABSTRACT

At the Animal Science Institute in Habana, Cuba, the *lactobacillus* and leavens of isolates from feces fermentation of lying hens which have a probiotic potential were identified. The experiment had a duration of 120 days which served to carry out the Feces Collection, Microorganism Isolation and Identification of the *Lactobacillus* and leavens using as a methodology identification criteria based on the morphology and biochemistry of the microorganisms. Among the principal results 3 types of colonies from the MRS culture (Man, Rogosa, Sneath) and 6 types of colonies from AM culture (Malt Extract Agar) are reported to be isolated. Of the isolated colonies from the MRS culture, the Strain 2 MRS was identified as a *Lactobacillus plantarum* and the Strain 3 MRS as a *Lacobacillus acidophilus* because of its features indicating the identification criteria such as bacteria basically, of bacillary form, gram (+), catalase (-) and their differences are in the growth at different temperatures and the biochemical profile of each species with a tested probiotic potential. Of the isolated colonies from the AM culture it was not possible to carry out an accurate identification because the Strain 3 AM shows an unknown behavior in literature and in the identification criteria. It is thought to be a new leaven genus or at least a new species of the genera Trichosporom or Cryptococcus, associated to diseases in human beings.

I. NTRODUCCIÓN

Durante décadas, los antibióticos se han utilizado como promotores del crecimiento animal, pero su uso prolongado e indiscriminado creó serios problemas de resistencia microbiana y agudizó la aparición de efectos residuales en los alimentos para el consumo humano (Ferket, P. et al. 2002 y Gauthier, R. 2003). Además, cada día aumenta el número de antibióticos que han sido prohibidos como promotores del crecimiento animal. Por tales razones, se hizo necesario el estudio e introducción de aditivos, como los probióticos, en las prácticas de alimentación y manejo, que contribuyeran a evitar estos efectos negativos del uso de los antibióticos en la producción animal.

Los probióticos son aditivos alimentarios formados por microorganismos vivos que influyen beneficiosamente en la salud del hospedero (Guarner, F. y Schaafsma, G. 1998 y Schrezenmeir, J. y de Vrese, M. 2001). Dentro de los principales efectos del uso de probióticos en la producción animal se encuentran la supresión de microorganismos patógenos, alteración del metabolismo microbiano y del hospedero, estimulación de la respuesta inmune y acción hipocolesterolémica. Actualmente, no se conocen con exactitud los mecanismos a través de los cuales los probióticos ejercen estos efectos en el hospedero (Fons, M. et al. 2000). Aunque se ha podido observar que todos los mecanismos tienen un efecto multifactorial, que permiten la eubiosis de la microbiota gastrointestinal de los animales.

Entre los microorganismos más utilizados para la elaboración de estos productos se encuentran los cultivos microbianos puros, fundamentalmente de bacterias ácido lácticas y levaduras y los cultivos mixtos (Garlich, J. 1999). Las principales fuentes de obtención de estos microorganismos son el contenido gastrointestinal y las heces fecales. Sin embargo, también, se emplean productos obtenidos de la fermentación de materiales de plantas y de animales (Kalantzopoulos, G. 1997).

La gran diversidad de microorganismos existentes propició la generación de una amplia variedad de productos en el mercado internacional (Bittencourt, J. et al.

2001), con buenos resultados en los ensayos con diferentes especies de animales (Silva, A. et al. 1999, Jadamus, A. et al. 2001, Casula, G. y Cutting, S. 2002 y Donovan, D. et al. 2002). Según, Kontula, P. et al. (1999) los mejores resultados en la evaluación de estos productos se obtienen con el empleo de cepas autóctonas del tracto gastrointestinal, las cuales tienen mayores probabilidades de sobrevivir en el tracto de la especie en que fueron aisladas. No obstante, el *Lactobacillus rhamnosus* cepa GG se considera uno de los microorganismos más estudiados y evaluados como probiótico en diferentes especies y fue aislado de heces fecales humanas (Reid, G. 1999).

Uno de los mayores problemas con los probióticos es mantener la viabilidad de los cultivos microbianos, a lo largo del proceso de fabricación y su conservación, para que puedan ejercer su acción cuando sean ingeridos (Salazar, B. et al. 2005), unido al costo de las importaciones y a las regulaciones existentes en países, como la Unión Europea, que limitan la adquisición de nuevas cepas probióticas.

De ahí la necesidad de obtener nuevas cepas autóctonas, principalmente de *Lactobacillus* y levaduras, con potencialidades probióticas con destino a la producción animal.

Por lo tanto, la presente investigación tuvo como objetivos:

1. Aislar cepas de *Lactobacillus sp* y levaduras a partir de excretas fermentadas de aves.
2. Identificar las cepas aisladas candidatas a probiótico.
3. Crear un banco de germoplasma con potencialidad probiótica para fines académicos y comerciales.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. MICROBIOTA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE LAS AVES

Las aves tienen un alargado tracto gastrointestinal (TGI), formado por buche, proventrículo y ventrículo (molleja), duodeno, yeyuno e íleon, ciegos, colón-recto y cloaca. A lo largo de este tubo especializado se encuentran las diferentes poblaciones microbianas con más de cuatrocientas especies bacterianas que forman un ecosistema microbiano anaerobio complejo pero estable (Fuller, R. 1989 y Bengmark, S. 1998). Esta rica microbiota habita e interactúa en equilibrio (estado eubiósico) con el hospedero, participa en una multitud de actividades metabólicas y juega un importante papel en el crecimiento y productividad de los animales, como lo indica el gráfico 1. (Mackie, R. et al. 1997 y Mackie, R. y White, B. 1997).

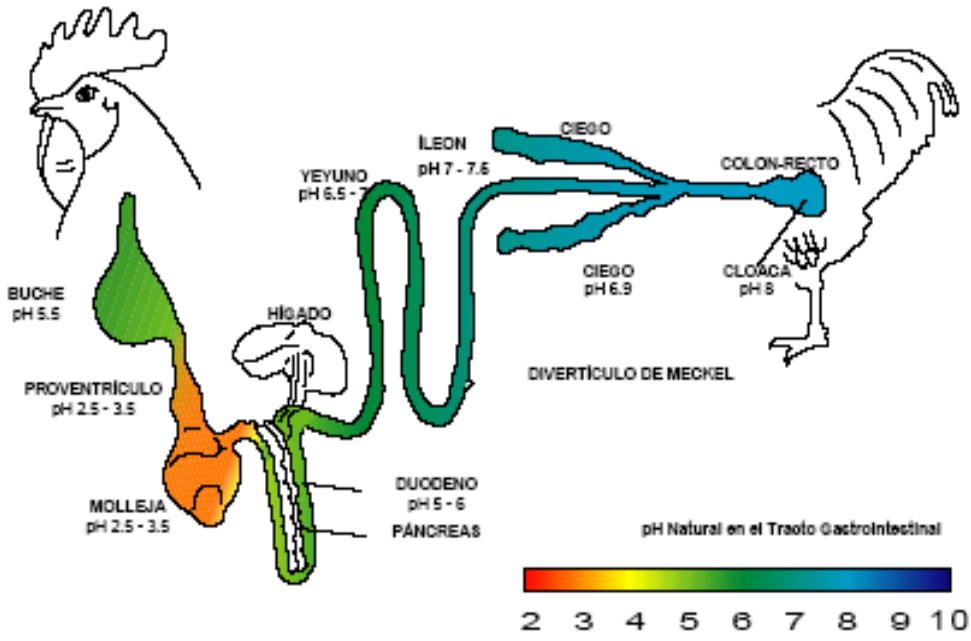


Gráfico 1. Tracto gastrointestinal de las aves. (Gauthier, R. 2003).

La microbiota intestinal interviene en la digestión del alimento consumido por el hospedero, además desarrolla, estimula y modula el sistema inmune del hospedero y es la primera barrera protectora para combatir infecciones microbianas (Pérez, M. 2000 y Guarner, F. 2002).

1. Composición de la Microbiota Gastrointestinal de las Aves

La microbiota gastrointestinal se puede clasificar en indígena o autóctona y transitoria o alóctona. Según Gedek, B. (1989), en los animales de granja con un estado eubiósico, esta se puede clasificar en tres grupos: la microbiota principal, la satélite y la residual. El grupo principal está representado por más del 90% de la microbiota total, principalmente anaerobios obligados donde predominan las bacterias formadoras de ácido láctico (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*) y las formadoras de ácidos grasos de cadena corta (*Eubacterium* y especies de la familia *Bacteriodiceae*). La microbiota satélite (menos del 1%) está representada por anaerobios facultativos, fundamentalmente *Escherichia coli* y *Enteroccocus*; y la microbiota residual representa menos del 0.01% y se ubican *Clostridium*, *Proteus, Staphylococcus, Pseudomonas*, levaduras del género *Candida* y otras bacterias no patógenas y facultativas.

Sin embargo, Savage, D. (1987), planteó que la microbiota de diferentes especies de animales no es idéntica, además su número y composición varía a lo largo del TGI y durante el crecimiento del animal (van der Wieler, P. et al. 2000). Por eso, se realizaron numerosos trabajos para conocer la composición de la microbiota del TGI de las aves aplicando los métodos clásicos de cultivo (Barnes. et al. 1972, Salanitro, J. et al. 1974 y van der Wieler, P. et al. 2000).

No obstante, sólo menos del 10% del total de la comunidad bacteriana se detecta por los métodos de cultivo (Apajalahti, J. y Kettunen, A. 2002), lo que hace que el TGI y su microbiota sea motivo de nuevas investigaciones. En este sentido, el desarrollo de las técnicas moleculares brinda múltiples ventajas. Actualmente se emplean métodos combinados para realizar un estudio más detallado de la comunidad bacteriana intestinal.

Los resultados de los trabajos desarrollados en este campo confirman, independientemente del método empleado, que el TGI de las aves tiene una rica microbiota formada por diferentes géneros y especies microbianas que se desarrolla según las características fisiológicas de la región y que se puede afectar

por diferentes factores que se dividen en dos grupos: alogénicos y autogénicos (Savage, D. 1984). Los primeros son los ejercidos por el hospedero mientras que los segundos tienen su origen en la propia microbiota.

Entre los factores alogénicos se encuentran el pH intestinal, potencial de oxidación-reducción, composición de la dieta, edad del animal, peristaltismo, excesiva higiene y condiciones ambientales que provocan estrés en los animales. Mientras que las interacciones entre microorganismos y las interacciones entre los microorganismos y el hospedero se encuentran dentro de los factores autogénicos, los que permiten la autorregulación de la microbiota.

B. RESIDUALES AVÍCOLAS

En la producción avícola, las excretas se pueden encontrar en forma de gallinaza y pollinaza. La primera se conoce como la mezcla de heces y orina que se obtiene de la gallina o pollo enjaulado, a la que se une la porción no digerible de los alimentos, células de descamaciones de la mucosa del aparato digestivo, productos de secreción de las glándulas, microorganismos de la biota intestinal, diversas sales minerales, plumas y un porcentaje ínfimo de material extraño (Marshall, W. 2000). Mientras, la pollinaza es el material utilizado como cama (cáscara de arroz, viruta de madera, cascarilla de café, bagazo de caña, heno molido y otros), mezclado con las deyecciones (Kelley, T. et al. 1996, Terzich, M. et al. 2000 y Tiquia, S. y Tam, N. 2000).

1. Disponibilidad de los Residuales Avícolas

Anon, J. (2000), señaló que un pollo de ceba, produce de 0.2 a 0.3 kg de MS de excreta por cada kilo de alimento consumido, lo que significa un volumen total de 0.7 a 0.8 kg de MS por pollo cebado. Por otra parte, Ensminger, M. (1992), informó que las aves confinadas producen 4.5 toneladas de excretas por cada 1000 libras de peso vivo.

En las condiciones actuales de Cuba, según Ortiz, A. (2004), la producción de excretas en base seca por estos dos conceptos (gallinas ponedoras y pollo de ceba), sobrepasa las 50 000 toneladas. Además, este autor señala que si a esto se le añaden el reemplazo de ponedoras y el material de cama (pollinaza), de todas las categorías de aves que se crían en piso (pollo de ceba, reproductores pesados, reproductores ligeros, inicio de ponedora, reproductores e inicio de semirrústico y otras especies como: pato, pavo y ganso), el volumen total de residuos de la avicultura en el país superaría las 100 000 toneladas anuales.

En los Estados Unidos cada año se producen más de 100 millones de toneladas de excretas en base seca (Fontenot, J. 1999) y 5.6 millones de toneladas de camas en base seca (Food and Drug Admisnitration 2001 citado por Lu. et al. 2003).

También se estima que en el Reino Unido se producen, anualmente, 4.4 millones de toneladas de excretas de aves, que incluyen 2.2 millones de toneladas de cama de pollos de ceba y 1.5 millones de tonelada de excretas de ponedoras (Smith, et al. 2001).

Se prevee que para el año 2010 se generen grandes volúmenes de excretas, debido a que el estimado del consumo de carne para ese año será, aproximadamente, 55 millones de toneladas. Esto equivale a una producción viva anual de 74 millones de toneladas o cerca de 37 billones de aves de 2 kg (Lesson, S. 2003).

2. Valor Nutritivo y Aplicaciones de las Excretas de Aves

Las deyecciones avícolas contienen compuestos orgánicos e inorgánicos (Moguel, Y. et al. 1995 y Pacheco, A. et al. 2003), una cantidad variable de humedad (Marshall, W. et al., 1998) y una abundante población microbiana (Martin, S. et al. 1998). La composición química de la gallinaza varía en función de factores como la composición de la ración, edad y estado fisiológico de las aves (Blair, R. 1974). También, Rosete, A. et al. (1988) y Marshall, W. et al.

(1998), señalaron que la edad de las excretas (tiempo de acumulación en la unidad), es otro factor de importancia en la variación de su composición, determinado por la volatilización del nitrógeno.

El valor nutritivo de estos residuos es mayor que el de otras excretas de animales, pues son, especialmente, ricos en proteínas y minerales como indica el Cuadro 1. Sin embargo, el alto contenido en fibra de las camas y nitrógeno no proteico de las excretas de aves determinan que los rumiantes sean considerados los animales más indicados para su consumo.

Aunque las gallinazas y pollinazas, como materiales de desecho, son fuentes potenciales de microorganismos patógenos que pueden provocar enfermedades en los animales que los consumen, ninguno de los estudios microbiológicos realizados con estos materiales mediante métodos estándares de cultivo (Martin, S. et al. 1998, Terzich, M. et al. 2000 y Ortiz, A. 2004) y por detección molecular (Lu, J. et al. 2003) informan la presencia de patógenos (*Salmonellas, Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp. y *Listeria* spp). Por el contrario, sí hacen saber la existencia de microorganismos beneficiosos como *Lactobacillus* y levaduras (García, Y. et al. 2005).

Por su composición, estas se han utilizado, principalmente, como fertilizantes orgánicos (Evers, G. 1998 y Smith, K. et al. 2001) y como ingredientes de las dietas para animales de granja (Pugh, D. et al. 1994 y Marshall, W. 2000). No obstante, los residuos avícolas también se han usado como sustrato para la generación de metano (Hidalgo-Gato, G. et al. 1988, Cortsen, L. et al. 1995 y Baydan, E. y Yildiz, G. 2000) y para la síntesis de proteína microbiana y de larvas de insectos (Inaoka, T. et al. 1999).

Cuadro 1. VALOR NUTRITIVO EN BASE SECA DE DIFERENTES EXCRETAS.

COMPOSICIÓN	TIPOS DE EXCRETAS				
	Excreta de pollos de ceba	Excreta deshidratada de ponedora	Excreta de buey	Excreta de vaca	Excreta de cerdo
Proteína bruta, %	31.30	28.00	20.3	12.70	23.50
Proteína verdadera, %	26.70	11.30	-	12.50	15.60
Proteína digerible, %	23.30	14.40	4.70	3.20	-
Ceniza, %	15.00	28.00	11.50	16.10	15.30
Calcio, %	2.40	8.80	0.87	-	2.72
Fósforo, %	1.80	2.50	1.60	-	2.13
Magnesio, %	0.44	0.67	0.40	-	0.93
Sodio, %	0.54	0.94	-	-	-
Potasio, %	1.78	2.33	0.50	-	1.34
Hierro, ppm	451	2000	1340	-	-
Cobre, ppm	98	150	31	63	-
Magnesio, ppm	225	406	147	-	-
Zinc, ppm	235	463	242	530	-

Fuente: Tomado de Fontenot, J. (1999).

3. Excretas Fermentadas

Las excretas, ecosistema donde coexisten múltiples géneros y especies de microorganismos provenientes del tracto gastrointestinal, desarrollan su biota natural al ser sometidas a procesos fermentativos convirtiéndolos en cultivos mixtos. En estos cultivos, los microbiólogos y ecologistas encontraron que el rango de crecimiento de los diferentes microorganismos se superpone, a pesar de las propiedades espaciales y temporales del hábitat. Por tal razón, se establecen entre las especies una amplia variedad de interacciones ecológicas como comensalismo, protocooperación, mutualismo, competencia, amensalismo,

parasitismo y depredación (Atlas, R. y Bartha, R. 1998), que propician la eliminación de los posibles patógenos. Este método de cultivo es el que se emplea, fundamentalmente, en el tratamiento de residuales para su reutilización.

En Cuba, en las décadas de los años '70 y '80, se realizaron un gran número de trabajos donde se suplementaron las dietas de diferentes especies animales con excretas fermentadas. El excremielaje (Hardy, C. y Elías, A. 1974), ensilaje de excreta bovina y miel final, fue suplementado en pollos de ceba (Romero, R. et al. 1977), cerdos en crecimiento y ceba (Díaz, C. y Elías, A. 1976, Díaz, C. et al. 1979 y Díaz, C. y Elías, A. 1983) y toros en crecimiento (Martín, S. et al. 1998), también, Díaz, C. et al. (1988), ensilaron excretas de preceba porcina con miel final para cerdas lactantes.

En 1996, Carrasco, E. et al. realizaron una serie de estudios con excretas vacunas y caña de azúcar para incrementar el contenido de biomasa proteica (Carrasco, E. et al. 1997 y 1998). Bocourt, R. et al. (1998), en este producto, observaron una disminución del número de *E. coli* después de las 24 h de iniciado el proceso y un incremento considerable de la concentración de *lactobacillus*.

También, en Colombia, Mendoza, R. (2001), fermentó excretas porcinas con melaza (EPOFERT). Este producto después de 30 d de fermentación tuvo condiciones sanitarias adecuadas y fue suministrado a cerdos en crecimiento y ceba sin afectaciones en su consumo.

C. PROBIÓTICOS

Aunque a principios del siglo pasado, Metchnikoff, E. (1907), describió los efectos beneficiosos de la ingestión de bacterias ácido láctico en la biota microbiana del TGI, no es hasta 1965 que Lilley, D. y Stillwell, R., utilizaron por primera vez el término probiótico, que se deriva del griego para la vida. Sin embargo, Parker, R. (1974), lo definió como organismo o sustancia que contribuye al balance microbiano intestinal de los animales. Esta definición era imprecisa, porque cualquier sustancia podía ser llamada probiótico. Por eso, Fuller, R. (1989),

definió a los probióticos como suplementos alimentarios vivos que afectan beneficiosamente al animal hospedero por el mejoramiento del balance microbiano intestinal.

Con el transcurso del tiempo este concepto evolucionó. En la actualidad, la mayoría de los autores coinciden en definirlos como aditivos alimentarios formados por microorganismos vivos que tienen un efecto beneficioso en la salud del hospedero (Guarner, F. y Schaafsma, G. 1998; Roberfroid, M. 2000 y Schrezenmeir, J. y de Vrese, M. 2001). La Organización Mundial de la Salud (OMS), junto con la FAO, definió a los probióticos como “microorganismos vivos, que cuando son ingeridos en cantidades adecuadas, confieren efectos benéficos al huésped”. (Henriquez, M. 2005).

Además actualmente los probióticos se consideran en el grupo de Alimentos Funcionales (AF), que son un amplio abanico de productos nutritivos y no nutritivos que no sólo alimentan, sino que modulan o actúan sobre determinadas funciones y elementos del organismo y tienen un efecto beneficioso en la salud del individuo. (Ferrer, B. y Dalmau, J. 2006). También, el concepto de Microorganismos Efectivos (EM) se utiliza, tanto en animales como en seres humanos, de tal forma que se aprobó en varios países, entre ellos los EEUU, cuyo Departamento de Agricultura incluyó a todos los EM, dentro de la categoría de G.R.A.S. (Generally Recognized As Safe). La United States Food and Drug Administration incluyó dichos microorganismos dentro de la categoría de "food grade” (aptos para usos alimentarios), (Uwe, R. y Saintmartin, R. 2007).

1. Modo de Acción de los Probióticos

A lo largo del siglo pasado, se desarrollaron numerosos trabajos para esclarecer los mecanismos de acción a través de los cuales los probióticos ejercen su efecto en el hospedero. Sin embargo, aún quedan muchas incógnitas por definir (Rahe, A. 1915, Savage, D. 1980 y Marteau. B. et al. 1997). No obstante, los mecanismos de acción de los probióticos pueden ser agrupados como se muestra en el Cuadro 2. Dentro de ellos, fundamentalmente, se destacan la producción de

bacteriocinas y la competencia por los sitios de adhesión. Aunque, se ha podido observar que todos estos mecanismos tienen un efecto multifactorial en el hospedero, que permiten la eubiosis de su microbiota gastrointestinal.

Cuadro 2. MODO DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS.

Efectos	Mecanismos	Fuentes
Acción hipocolesterolémica	Generación o producción de AGCC que inhiben la enzima hidroximetilglutaril-CoA-reductasa. Inhibición de la absorción de micelas de colesterol. Aumento de sales biliares desconjugadas.	Agerbæk et al. (1995), Cherie y Glenn (1998), Bertolami et al. (1999) y Taranto et al. (2000)
Supresión de microorganismos patógenos	Producción de sustancias antimicrobianas: ácidos orgánicos; H_2O_2; bacteriocinas. Competencia por nutrientes. Competencia por los sitios de adhesión.	Adams (1997), Walker y Duffy (1998) y Fons et al. (2000)
Alteración del metabolismo microbiano y del hospedero	Estimulación o producción de enzimas que intervienen en la digestión. Reducen la producción de toxinas. Sintetizan vitaminas y otros nutrientes deficientes en la dieta.	Klasing (1998), Goldin (1998) y Nomoto (2000)
Estimulación de respuesta inmune del hospedero	Activación de macrófagos. Estimulación de células inmunes o competentes. Generan altos niveles de inmunoglobulinas.	Famularo et al. (1997) y Roberfroid (2000)

Fuente: Garcia, Y. et al. (2005).

2. Microorganismos Empleados como Probióticos

Entre los microorganismos viables más utilizados como probióticos se encuentran las bacterias ácido lácticas, fundamentalmente *Lactobacillus* (Fuller, R. 1992). También se emplean *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium, Aspergillus, Bacteroides*, *Pediococcus*, *Leuconostoc,* y levaduras (Tobey, J. 1992 y Tannock, G. 1997). Además, recientemente, se incluyen cepas de *E. coli* no patógenas (Borruel, N. 2005). Las especies más empleadas en las preparaciones probióticas se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. ESPECIES DE MICROORGANISMOS COMÚNMENTE USADAS COMO PROBIÓTICOS.

Organismos	
Lactobacillus	*Streptococcus* (y otros Coccus Gram +)
L. acidophilus	*Lactococcus lactis subsp cremoris*
L. casei	*Streptococcus salivarius subsp thermophilus*
L. delbrueckii subsp. bulgaricus	*S. diaacetylactis*
L. reuteri	*S. intermedius*
L. brevis	*Enterococcus faecium*
L. cellobiosus	*E. faecalis*
L. curvatus	
L. fermentum	Bifidobacterias
L. plantarum	*Bifidobacterium bifidum*
L. gasseri	*B. animalis*
L. rhamnosus	*B. longum*
L. lactis	*B. thermophilum*
L. johnsonii	*B. pseudolongum*
Levaduras	*Bacillus*
Saccharomyces cerevisiae	*Bacillus lichenieformis*
S. boulardii	*B. subtilis*
	B. breve

Fuente: Garcia, Y. et al. (2005).

a. *Lactobacillus*

Son bacilos microaerófilos, gram positivo y catalasa negativa, estos organismos forman ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares. Los *Lactobacillus*, según los productos de fermentación de azúcar, se dividen en dos grupos. El grupo homofermentativo es el mayor y convierte casi completamente el azúcar fermentada en ácido láctico; el grupo heterofermentativo está constituido por formas que producen cantidades importantes de otros productos de fermentación, incluyendo bióxido de carbono, etanol y ácido acético. (Castillo, J. 2006). Morfológicamente, algunos bacilos son bastones delgados y largos; otros son algo parecido al colibacilo, pero, al contrario de este, todos son gran positivos. Casi todos son inmóviles, pero se han señalado excepciones. Muchos cultivos muestran una forma diplobacilar característica, a menudo reniforme. Frecuentemente los cultivos viejos muestran considerable pleomorfismo. (Castillo, J. 2006).

Los *Lactobacillus*, pueden desarrollarse en presencia de aire. Sus necesidades nutritivas son complejas, y la mayor parte de las cepas no puede cultivarse en los medios nutritivos ordinarios, a menos que se enriquezcan con glucosa y suero. (Castillo, J. 2006). Aunque se han encontrado raros casos de relación de *Lactobacillus* con procesos patológicos como endocarditis y enfermedad febril, estas bacterias esencialmente no son patógenas, excepto las raras veces que pueden relacionarse con caries dentales. Son fundamentalmente interesantes en la industria de derivados lácteos y de fermentación, donde tienen importancia considerable. (Castillo, J. 2006).

b. Levaduras

Se denomina levadura a cualquiera de los diversos hongos microscópicos unicelulares que son importantes por su capacidad para realizar la fermentación de hidratos de carbono, produciendo distintas sustancias. Las levaduras son organismos unicelulares. (Castillo, J. 2006).

Morfológicamente suelen ser esféricos, alargados. Tienen tendencia a depositarse en el fondo del líquido o flotar. Suelen formar cápsula. La mayoría de las levaduras tienen un ciclo de reproducción asexual por gemación. Las colonias tienen un ancho de 2,50 – 10,00 mm y de largo 4,50 – 21,00 mm, (Castillo, J. 2006).

Una de las levaduras más conocidas es la especie (Saccharomyces cerevisiae), esta levadura tiene la facultad de crecer en forma anaerobia realizando la fermentación alcohólica. Por esta razón se emplea en muchos procesos de fermentación industrial, de forma similar a la levadura química, por ejemplo en la producción de cerveza, vino, hidromiel, pan, producción de antibióticos, prebiótico y otros.

D. CARACTERIZACIÓN DE *LACTOBACILLUS* Y LEVADURAS

La caracterización de los microorganismos a sido una necesidad de los microbiólogos a lo largo de los años, es así que ya en el siglo XIX, se dieron las primeras caracterizaciones, basadas en los análisis bioquímicos sometidos a distintos colonias de microorganismos, siendo Pasteur que en el año 1857 ya daba referencia sobre las bacterias ácido lácticas, reafirmando y definiendo nuevas características de este grupo de bacterias, lo hicieron también Lister, en 1873 y Weigmann en 1890, (Wahren, M. 1990).

La continuidad que se ha dado a la identificación de microorganismos ha hecho que esta se base en técnicas utilizadas en el siglo pasado principalmente con el análisis del perfil bioquímico de los microorganismos y nuevas técnicas más complejas que refieren al perfil molecular de los microorganismos, siendo estas dos alternativas la forma mas idónea de identificar. Para caracterizar los microorganismos; por la vía taxonómica, que sugiere la utilización de varios referencias literarias, como el caso del Manual de Sistemas Bacteriológicos de Bergey´s que nos indica las claves taxonómicas y perfiles bioquímicas de cada microorganismo; así también se sugieren un software que tiene en su base de datos de los perfiles bioquímicas y realiza una comparación de los hallados en las

colonias estudiadas de los microorganismos y caracterización biomolecular mencionado anteriormente, (Wahren, M. 1990).

El *Lactobacillus rhamnosus* cepa GG se considera uno de los microorganismos más estudiados y evaluados como probiótico en diferentes especies y fue aislado de heces fecales humanas (Reid, G. 1999).

Mejia, J. (2001), aisló e identificó 25 cepas de lactobacillus a partir de 360 colonias obtenidas de muestras vaginales de jóvenes, heces fecales de niños y residuos de la industria láctea, estas lactobacillus fueron identificadas por pruebas bioquímicas tradicionales y comparadas con los perfiles bioquímicas de los *lactobacillus* existentes.

El método molecular es empleado por Beasly, S. (2004), para identificar bacterias ácidos lácticas, de esta manera se hace una caracterización genética de los microorganismos identificados como *Lactococcus lactis* a partir de la leche materna humana; *Lactobacillus crispatus* a partir de el tracto gastro intestinal y excretas de aves de ceba; *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus salivarius*, a partir de heces fecales de perros.

Aislando y caracterizando levaduras Marrero Y., en el 2005 utilizo varias pruebas bioquímicas en las que se destacan los métodos de Kreger Van – rig, con algunas adaptaciones, que sugiere pruebas como: Hidrólisis de la urea, Fermentación del almidón y Presión osmótica elevada, entre otras que rigieron para su investigación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO

El trabajo se desarrolló en un período de 120 días, en el Laboratorio de Microbiología del Dpto. de Fisiología y Bioquímica del Instituto de Ciencia Animal. Este centro forma parte del complejo de instituciones de la Universidad Agraria de la Habana (UNAH), "Fructuoso Rodríguez Pérez" y se encuentra situado en la Carretera Central a 47½ Km. de la Ciudad de la Habana.

B. UNIDADES EXPERIMENTALES

1. Recolección de Excretas

Se utilizaron 240 aves (White Legorhn), de 7 semanas de edad alojadas en jaulas metálicas de un metro cuadrado, con una densidad de 30 aves/m^2, donde cada jaula constituyó una unidad experimental.

2. Aislamiento de Microorganismos

Se utilizaron erlenmeyers de 500 ml con 100 ml de caldo Rogosa para *Lactobacillus* y caldo Extracto de Malta para levaduras, con tres repeticiones por medio. Es decir 6 erlenmeyers en total, distribuidos respectivamente en 3 erlenmeyers para caldo Rogosa y 3 erlenmeyers para caldo Extracto de Malta, siendo cada erlenmeyers una unidad experimental.

3. Identificación de los Microorganismos

Todos los aislados que presentaron morfología diferente se consideraron una unidad experimental. Siendo estos en total 9 tipos de cultivos diferentes, distribuidos de la siguiente forma: 3 tipos de colonias aisladas a partir del cultivo Man, Rogosa, Sneath, (MRS) y 6 tipos de colonias aisladas del cultivo Agar Extracto de Malta.

C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES

La recolección de excretas se realizó, en las naves de aves del Instituto de Ciencia Animal y el resto del trabajo experimental en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología del Departamento de Fisiología del Centro.

Materiales y equipos utilizados:
Cajas petri
Erlenmeyers de 500 ml
Erlenmeyers de 1000 ml
Pipetas automáticas
Puntas plásticas estériles
Agujas de platino (asas)
Incubadoras
Kit api de fermentacion de azúcares
Tubos eppendorff
Espátulas de Drigalski
Tubos de cultivo
Asas de cultivo

Reactivos y medios de cultivo:
Agar extracto de malta
Sulfato de hierro
Agua peptona
Agar
Triptona
Glucosa
Extracto de levadura
Almidón soluble
Tween 80
Dihidrógeno fosfato de potasio
Citrato de amonio
Acetato de sodio
Sulfato de magnesio
Sulfato de manganeso
Extracto de carne
Acido acético
Estreptomicina

D. TRATAMIENTOS Y DISEÑOS EXPERIMENTALES

Por ser una investigación de tipo exploratoria no se utilizó tratamientos ni diseño experimental.

E. MEDICIONES EXPERIMENTALES

- Características Culturales
- Capacidad de Crecimiento de las Cepas
- Morfología de las Cepas
- Producción de Catalasa
- Producción de Gas
- Fermentación de Azúcares
- Asimilación de Azúcares
- Tinción de Gram
- Utilización de Urea
- Presión Osmótica

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA

En este trabajo por sus características, no se realizó análisis estadísticos paramétricos y pruebas de significancia, sino más bien un análisis objetivo de tipo numérico y cualitativo.

G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. <u>Aislamiento</u>

a. Muestreo de Excretas

Se tomaron ± 200 g de excretas de diferentes puntos de una nave de ponedoras y se colocaron en bolsas estériles hasta su posterior análisis. Las muestras se mezclaron para alcanzar la homogeneidad. Las excretas se recolectaron en un período de 24 h y provenían de aves ponedoras que consumieron una dieta basada, fundamentalmente, en maíz y soya (Cuadro 4), que varió en su composición, según los requerimientos nutricionales para ponedoras ligeras (NRC 1994). Los alimentos y el agua se suministraron *ad-libitum*.

Cuadro 4. DIETA DE REMPLAZO EN PONEDORAS Y APORTES NUTRICIONALES.

MATERIA PRIMA	**%**
Harina de Maíz	63,750
Harina de Soya	20,000
Salvado de Trigo	10,000
Carbonato de Calcio	2,170
Fosfato dicalcico	1,530
Aceite	1,000
Premezcla	1,000
Sal	0,150
Lisina	0,100
Colina	0,300
TOTAL	100,000
APORTES	
Proteína Bruta	14,66 %
Energia Metabolizable	2863 Kcal
Ca	1,20
P	0,40
NaCl	0,32
Metionina + Cisterna	0,66
Lisina	0,82

Fuente: Unidad de Producción Avícola. (2008).

b. Proceso de Fermentación de las Excretas

La fermentación se realizó en erlenmeyers de 500 mL con 100 mL de caldo selectivo Rogosa y Extracto de Malta para *Lactobacillus* y levaduras, respectivamente. En ambos casos se inoculo 5 % de excreta (p/v). El proceso de fermentación fue en condiciones estáticas durante 24 h a 37 y 32 °C, respectivamente.

c. Medios de Cultivo y Conservación

En el proceso fermentativo para el cultivo de *Lactobacillus* se empleó el caldo Rogosa (Rogosa, M. et al. 1951) y para las levaduras caldo Extracto de Malta (Anon, J. 1990). Posteriormente para el aislamiento se emplearon los mismos medios selectivos en forma sólida. La purificación de las colonias de *Lactobacillus* se realizó en Agar MRS y las de levaduras en Agar Sabouroud. Los aislados de *Lactobacillus* se conservaron en un medio Tioglicolato USP (Anon, J. 1990), con la adición de Carbonato de calcio ($CaCO_3$), al 2 % y las levaduras en tubos de cultivo con cuñas de Agar Extracto de Malta.

d. Método de Aislamiento y Conservación de los Aislados

El aislamiento de cepas de *Lactobacillus* y levaduras se realizó según el método de las diluciones seriadas (Silva, A. et al. 1999). Se sembraron alícuotas de 0,1 ml en cajas petri con los medios selectivos. Las muestras fueron extendidas con auxilio de un rastrillo de vidrio (espátula de Drigalsky) y se aplicó una doble capa de medio en el caso de los *Lactobacillus*. Las placas fueron incubadas a 37 y 32 °C, respectivamente, durante 48-72 h o más hasta observar crecimiento de colonias aisladas. De cada caja de petri se seleccionaron aquellas colonias que mostraron morfología diferente entre ellas, posteriormente se sembraron por triplicado en tubos de cultivo con caldo Extracto de Malta, Agar Sabouroud y Agar Extracto de Malta para levaduras; y en tubos de cultivo con caldo MRS y en tioglicolato con $CaCO_3$ al 2% para *Lactobacillus*. Los cultivos puros crecidos fueron conservados en refrigeración para su posterior caracterización.

2. <u>Identificación de los Microorganismos</u>

a. *Lactobacillus*

(1) Características Culturales: Con observaciones macroscópicas y microscópicas, se determinaron las características propias de cada colonia como son el color, textura, forma, traslucidez, formación de los bordes y elevación.

A cada cepa aislada se le realizaron dos pruebas preliminares: tinción de Gram y prueba de la catalasa. A partir de los resultados de ambas pruebas, se seleccionaron las colonias catalasa-negativas y aquellas cuyas células resultaron ser morfológicamente bacilos Gram-positivos no esporulados.

(2) Tinción de Gram: En las muestras aisladas se aplicó esta tinción, precisando si son Gram positivas o Gram negativas de acuerdo a lo que manifiesta (Taborda, N. Florez, V. y Giraldo, D. 2007). Este es un procedimiento utilizado universalmente. En un primer momento las bacterias se tiñen con violeta de genciana (derivado metilado anilínico) y después se tratan con la solución de Gram (1 parte de yodo, 2 partes de yoduro potásico y 300 partes de agua); por último se lavan con alcohol etílico, y unas bacterias retienen el fuerte color azul de la violeta de genciana y otras se decoloran por completo. A veces se añade una contratinción con fucsina o eosina para teñir las bacterias decoloradas de color rojo y hacerlas más visibles.

Se denominan bacterias Gram positivas a aquellas que retienen la tinción azul y bacterias Gram negativas a las que quedan decoloradas.

(3) Catalasa: Se basa en la capacidad de la enzima catalasa de descomponer el peróxido de hidrógeno añadido, formándose agua y O_2, el cual se libera en forma de burbujas. Al ser éste un compuesto muy oxidante las bacterias la eliminan mediante la producción de la enzima catalasa (H_2O_2 -> H_2O + ½ O_2). (Universidad de Santiago de Chile, 2007).
Agregamos aproximadamente 5 ml de peróxido de hidrógeno al 3% a un tubo de ensayo previamente esterilizado a continuación tomamos una muestra de la cepa del microorganismo a estudiar y la introducimos directamente en la caja petri, la muestra solamente debe acercarse a la muestra de la solución líquida de peróxido de hidrogeno y debemos observar la reacción de esta. La prueba se considera como positiva si observamos burbujas de oxígeno. (Universidad de Santiago de Chile, 2007).

(4) Crecimiento a Diferentes Temperaturas en un Medio Líquido: Hacer distintos inoculaciones en un medio líquido y someter a temperaturas de

crecimiento de 15ºC, 37ºC y 45ºC. Dependiendo del género de *lactobacillus* será su crecimiento a distintas temperaturas.

(5) Fermentación de Azúcares: Este se realiza a través de la galería API 50 CHL (bioMériux), como se detalla a continuación.

El API 50 CHL Medium, está destinado a la identificación del género *Lactobacillus* y microorganismos próximos, permite realizar el estudio de fermentación de 49 azúcares de la galería API CH.

El microorganismo por estudiar se pone en suspensión en el medio y después se inocula en cada tubo de la galería. Durante la incubación, el catabolismo de los glucósidos produce ácidos orgánicos que hacen virar el indicador del pH. Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico de la cepa y sirven para su identificación o su biotipaje.

La Selección de las colonias se realiza:

- Verificando la pureza de la cepa.
- Cultivando en medio MRS gelosado 24 h a 30 o 37ºC en anaerobiosis. La temperatura de incubación varía según el origen de la cepa.
- Verificando su pertenencia a las bacterias lácticas: bacilos Gram (+), catalasa (-), no esporulados, anaerobios (estrictos o facultativos), cultivables sobre medio MRS.

La preparación del inóculo se realiza de la siguiente forma:

- Abrir una ampolla de Suspensión Medium (2 ml), o utilizar un tubo de agua destilada estéril sin aditivo.
- Tomar todas las bacterias del cultivo con la ayuda de un asa y realizar una suspensión densa (S), en la ampolla.
- Abrir una ampolla de Suspensión Medium (5 ml) y realizar una suspensión de turbidez igual a 2 de McFarland transfiriendo un cierto número de gotas de la suspensión S: anotar este número de gotas (n).

- Abrir una ampolla de API 50 CHL Medium e inocular 2 veces el número de gotas encontradas (o sea 2n).
- Homogeneizar.

La inoculación de la galería se realiza de la siguiente forma:

- Repartir el API 50 CHL Medium así inoculado solo en los tubos y recubrir los tests con aceite de parafina.
- Incubar a 30 o 37ºC en anaerobiosis durante 48 horas.

La lectura de la galería se hace de la siguiente manera:

- Leer después de 24 y 48 horas de incubación.
- En cada tubo se estudia la acidificación producida, que se traduce porque vira al amarillo el púrpura de bromocresol contenido en el medio.
- En el test de esculina (tubo no. 25), se observa un viraje del púrpura al negro.
- Registrar los resultados en la hoja de resultados.

La interpretación de los resultados se detalla según:

El perfil bioquímico así obtenido puede ser:

- Identificado gracias al programa computarizado de identificación.
- Registrado tal cual, definiendo un biotipo de una especie determinada anteriormente.
- Utilizando con otros perfiles para un estudio taxonómico.

b. Levaduras

(1) Características Culturales: Se observa si son esféricos, alargados, color, tamaño. Tienen tendencia a depositarse en el fondo del líquido o flotar. Se revisa la morfología como primer paso de identificación, este proceso se realiza tomando una muestra del cultivo en con un bastón de siembra, se ubica la muestra en una placa porta objeto, se hace un frotis, como siguiente paso se

coloca una gota de aceite de cedro, por ultimo se observa al microscopio hasta llegar al lente de 100X. (Cortes, J. 2002).

(2) Tinción Gram: Se aplica la misma técnica utilizada para los *lactobacillus.*

(3) Morfología: Se observa si los microorganismos forman Seudomicelios, Micelio, Clamidosporas, para este proceso se incuban los microorganismos en un medio Sabouroud o Agar Malta a una temperatura de 25ºC y se procede a observar al microscopio. Para la formación de Ascosporas se incuba los microorganismos en un medio para la formación de Ascosporas, a una temperatura de 20ºC a 25ºC, posteriormente la observación en el microscopio se hace pasado las 72 horas.

(4) Utilización de Urea: La urea es un compuesto orgánico nitrogenado que es transformado por los microorganismos, los cuales producen la enzima ureasa. Como resultado de esta actividad microbiana el nitrógeno es liberado al medio en forma inorgánica. Cuando esta reacción ocurre el medio de cultivo se alcaliniza y el indicador permite percibir visualmente el cambio en acidez del medio. (Rodriguez, M. 2007).

(5) Presión Osmótica: Se observa el crecimiento de las cepas en un medio selectivo para el crecimiento en presión osmótica elevada, se incuba a 25ºC y se toma los datos a partir del quinto día de incubación.

(6) Fermentación de Azúcares: Este se realiza a través de la galería API 20C AUX (bioMériux), como se detalla a continuación:

El API 20C AUX está constituido por 20 cúpulas conteniendo sustratos deshidratados que permiten efectuar 19 test de asimilación. Las cúpulas son inoculadas con un medio semisólido y las levaduras crecen únicamente si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente.

La lectura de estas reacciones se hace por comparación con los controles de crecimiento, y la identificación se obtiene con la ayuda de la tabla de identificación, el catálogo analítico o el software APILAB.

La preparación del inóculo se realiza de la siguiente forma:

- Abrir una ampolla de Suspensión Medium (2 ml) o utilizar un tubo de agua destilada estéril sin aditivo.
- Tomar las colonias del cultivo con la ayuda de un escobillón y realizar una suspensión de turbidez igual a 2 de McFarland.
- Abrir una ampolla de C Medium (5 ml) y transferir 100 µl (3 gotas de pipeta Pasteur de la suspensión precedente). Homogenizar con la pipeta evitando la formación de burbujas.

La inoculación de la galería se realiza de la siguiente forma:

- Llenar las cúpulas con la suspensión obtenida en C Medium. Evitar la formación de burbujas, apoyando la punta de la pipeta sobre el borde de la cúpula. Llenar hasta obtener un nivel horizontal o ligeramente convexo, nunca cóncavo. Las cúpulas incompletamente o demasiado llenas pueden dar resultados incorrectos.
- Cerrar la cámara de incubación e incubar 24-72 horas a 30 ºC.

La lectura de la galería se hace de la siguiente manera:

- Leer después de 24, 48 o eventualmente 72 horas de incubación. Si los tests (y en particular la glucosa) no son muy netos, pasadas las 48 horas, observar el crecimiento de las levaduras: la cúpula 0 sirve de control negativo. Una cúpula más turbia que el control indica reacción positiva, y se anota en la hoja de resultados.

Nota: en el caso de que la lectura no pueda hacerse a las 72 horas, es posible realizarla al cabo de los 4 días.

La interpretación de los resultados se detalla según:

- La identificación se realiza con la tabla de identificación. Comparando las reacciones anotadas en la hoja de resultados.

(7) Asimilación de Azúcares: Se realizara la técnica de Araujo, la cual es una modificación del método de Beijerinck. Usando una aguja de inoculación previamente esterilizada con un mechero, se humedeció 2 mm de la punta de la misma con agua estéril y, posteriormente se impregnó dicha punta con cada una de las sustancias a evaluar correspondientes a la fuente carbonada o nitrogenada en estudio. Se introdujo la punta de la aguja perpendicularmente a la superficie del medio de cultivo que estará inoculado con el microorganismo a evaluar, que será el medio Lodder, en el sitio previamente asignado y rotulado en el fondo de la placa. Posteriormente, las placas se incubaran a 35℃, la lectura se realiza a partir de la 24 horas hasta un máximo de 7 días.

H. METODOLOGÍA DE LA EVALUACIÓN

1. Aislamiento de Las Cepas: Método de diluciones seriadas.

2. Identificación de *Lactobacillus*: Pruebas bioquímicas:

- Características Culturales
- Tinción de Gram
- Catalasa
- Crecimiento a Diferentes Temperaturas en un Medio Líquido
- Fermentación de Azúcares

3. Identificación de Levaduras: Pruebas bioquímicas:

- Características Culturales
- Tinción de Gram
- Morfología
- Utilización de Urea
- Presión Osmótica
- Fermentación de Azúcares
- Asimilación de Azúcares

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. AISLAMIENTO DE LAS CEPAS

Los resultados obtenidos a partir del crecimiento del cultivo MRS nos determinan 3 tipos de colonias aisladas y para el cultivo en Agar Extracto de Malta 6 tipos de colonias aisladas, siendo estos resultados iniciales y la base para estudiar la identificación de *lactobacillus sp* y levaduras respectivamente.

B. IDENTIFICACIÓN DE *LACTOBACILLUS*

1. Características Culturales: Después de la observación de forma macroscópica y microscópica de los aislados los resultados se reportan en el cuadro 5. Estos resultados obtenidos describen morfológicamente a las colonias, de esta manera hacemos un acercamiento de nuestras colonias, con la morfología de distintas colonias de *Lactobacillus sp* conocidos. De esta manera se determina que las colonias 1 y 3 del cultivo Agar Malta, presentan características iguales, a continuación se realizó pruebas bioquímicas las cuales detallaran las características bioquímicas de las cepas 1 y 3, por lo tanto las cepas 1, 2 y 3 del cultivo Agar Malta, por presentar una forma bacilar tienden a ser colonias de *Lactobacillus sp*, como describe en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (Sneath, P. 1986).

2. Tinción de Gram: Los 3 tipos de colonias aisladas, es decir las colonias 1, 2 y 3 demuestran ser Gram (+), en ningún tipo de colonia se avista una tinsión distinta al violeta que nos indica la técnica. Por lo indicado por Sneath, P. 1986, las bacterias que están dentro del grupo de *lactobacillus* son Gram (+), por lo tanto las colonias 1, 2 y 3 tienen tendencia a ser *Lactobacillus*, sin descartar otro tipo de bacterias que también pueden presentar esta característica.

Cuadro 5. CARACTERÍSTICAS CULTURALES DE LA IDENTIFICACIÓN DE *LACTOBACILLUS SP.*

	COLOR	TEXTURA	ELEVACION	TRASLUCIDES	FORMA	BORDES	FORMA CELULAR
CEPA 1	Blanco	Pastosa	Convexa	Transparente	Redonda	Regular	Bacilar
CEPA 2	Blanco-Crema	Pastosa	Convexa	Opaca	Redonda	Regular	Bacilar
CEPA 3	Blanco	Pastosa	Convexa	Transparente	Redonda	Regular	Bacilar

Fuente: Salas, M. (2008).

3. <u>Catalasa</u>: La prueba descarta a la cepa 1 al demostrar ser, catalasa (+), como indica el gráfico 2, mientras que las cepas 2 y 3 demuestran ser catalasa (-), como lo muestra el gráfico 3 y gráfico 4.

Los *Lactobacillus sp*, son un grupo heterogéneo, de forma bacilar, gram (+), catalasa (-) y no esporulados, (Sneath,P. 1986). Por lo tanto las colonias 2 y 3 del cultivo Agar Malta, se determinan que son *Lactobacillus sp*, por haber cumplido con dichas características mencionadas en el Manual Bergey's. "Los *lactobacillus* son microorganismos que poseen un formación celular de tipo bacilar; responden a la tinsión Gram de forma positiva; a la prueba de catalasa los cultivos desprenden gas (CO_2), en forma de burbujas".

4. <u>Crecimiento a Diferentes Temperaturas en un Medio Líquido</u>: Se demuestra que las cepas 2 y 3 son diferente especie de *lactobacillus* ya que la cepa 2 muestra crecimiento a 15º C, mientras que a 38º C y 45º C el crecimiento de esta cepa es nulo. Al contrario la cepa 3 tiene crecimiento a 45º C, pero a 38º C y 15º C no muestra ningún tipo de crecimiento. Como indica el cuadro 6; además en el cuadro 7 indica las posibles especies de *Lactobacillus sp*.

5. <u>Fermentación de Azúcares</u>: Después de haber realizado las pruebas de identificación preliminar, las cepas 2 y 3 del medio MRS, al determinarse que son *Lactobacillus sp* fueron sometidas al test api 50 CHL (bioMériux). Obteniéndose como resultado lo indicado en el cuadro 8.

De esta forma se determina que la cepa 2 fermenta a los siguientes azucares:

Glicerol, L-arabinosa, Ribosa, Galactosa, Glucosa, Fructosa, Manosa, Sorbosa, Rhamnosa, Manitol, Sorbitol, α-Metil-D-Mannosido, N-Acetil-Glucosamina, Amigdalina, Arbutina, Esculina, Salicina, Celobiosa, Maltosa, Lactosa, Melibiosa, Sacarosa, Trehalosa, Rafinosa, Almidón, Glicógeno, Gentiobiosa, D-Turanosa, D-Tagatosa, 2-Keto-Gluconato.

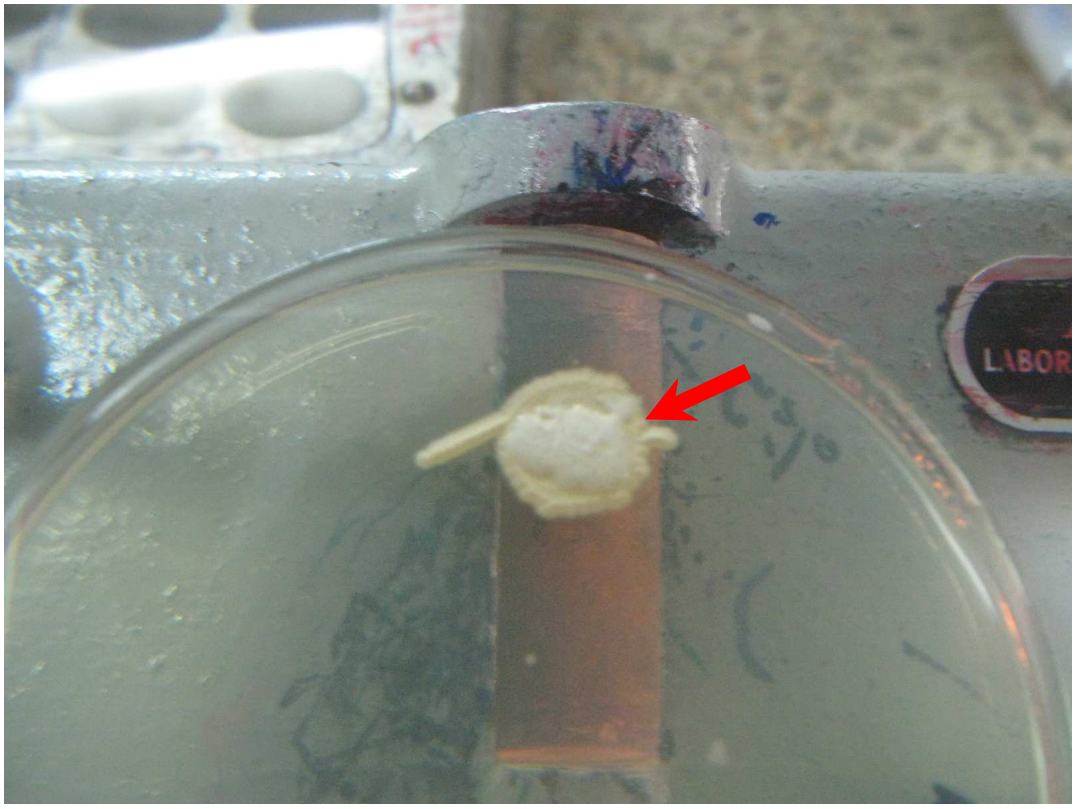


Gráfico 2. Cepa 1, catalasa (+), indica la formación de burbujas.

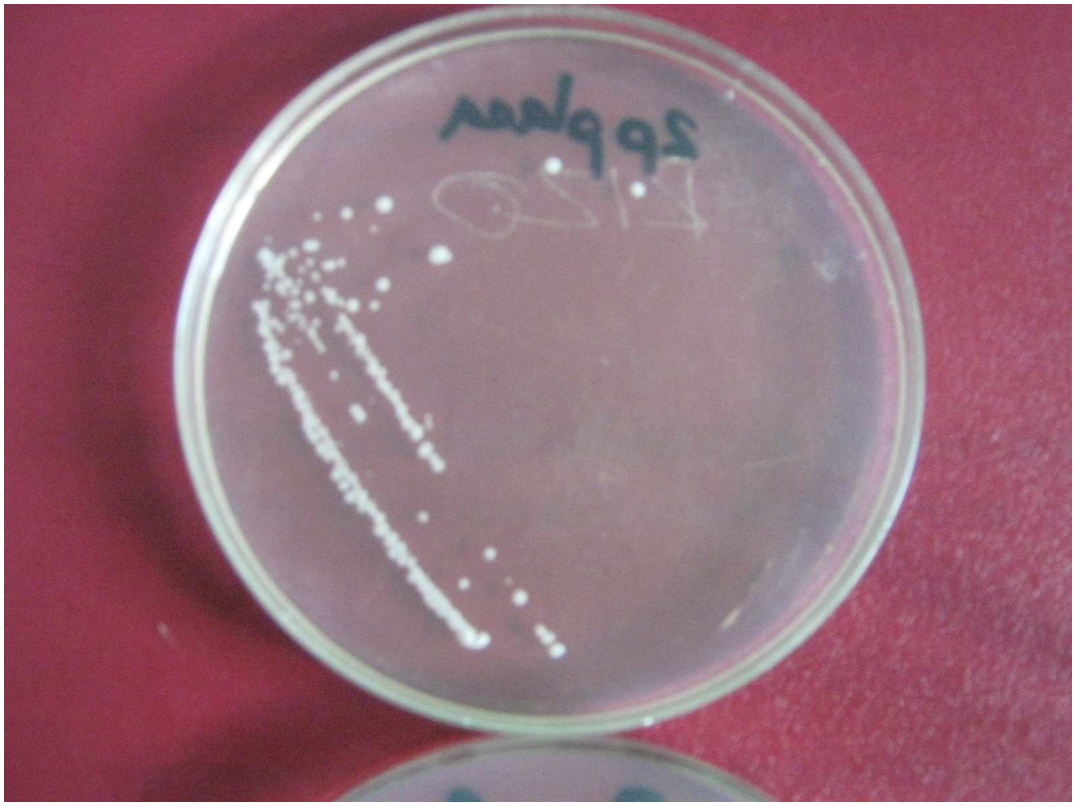


Gráfico 3. Cepa 2, catalasa (–), sin formación de burbujas.

Gráfico 4. Cepa 3, catalasa (–), sin formación de burbujas.

Cuadro 6. COMPORTAMIENTO DEL CRECIMIENTO DE *LACTOBACILLUS SP* A DISTINTAS TEMPERATURAS.

CEPAS	TEMPERATURAS |℃		
	15	38	45
2	+	-	-
3	-	-	+

Fuente: Salas, M. (2008).

(+): Crecimiento positivo; (-): Crecimiento nulo.

Cuadro 7. CRECIMIENTO DE *LACTOBACILLUS SP* A 15 ºC Y 45 ºC

		Homofermentativos							Heterofermentativos	
		Termófilos					Mesófilos		Termófilo	Mesófilo
		Lb. helveticus	*Lb. Jugurti*	*Lb. bulgaricus*	*Lb. lactis*	*Lb. acidophilus*	*Lb. casei*	*Lb. plantarum*	*Lb. fermentis*	*Lb. brevis*
Cultivo A Tº	15º C	-	-	-	-	-	+	+	-	+
	45º C	+	+	+	+	+	-	-	+	-

Fuente: Castillo, J. 2006.

Cuadro 8. RESULTADOS FERMENTACION DE AZÚCARES CEPA 2 Y 3 MRS (TEST API 50 CHL A 24 Y 48 HORAS).

CEPAS	horas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
2 MRS	24 h	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
2 MRS	48 h	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
3 MRS	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3MRS	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+

CEPAS	horas	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
2 MRS	24 h	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2 MRS	48 h	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
3 MRS	24 h	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 MRS	48 h	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Salas, M. (2008).

La cepa 3 fermenta a los siguientes azucares:

Galactosa, Glucosa, Fructosa, Manosa, Manitol, N-Acetil-Glucosamina, Arbutina, Esculina, Salicina, Celobiosa, Maltosa, Sacarosa, Rafinosa, Almidón.

De acuerdo a la lectura del perfil bioquímico de la galería api y las pruebas preliminares se identificó que:

La cepa 2 es un *Lactobacillus plantarum*, por cumplir con las siguientes características; es una bacteria de forma bacilar, gram (+), catalasa (-), crece a una temperatura de 15º C y fermenta principalmente los siguientes azúcares Maltosa, Salicina, Sacarosa, Trealosa, Melibiosa, Amigdalina, Celobiosa, Manitol, Sorbitol, y Rafinosa. (Sneath, P. 1986). Así mismo estas características concuerdan con lo manifestado por Castillo, J. (2006), que además de describir las características de la cepa 2, precisa otras características resultado de otras pruebas bioquímicas anexas en su trabajo como la el porcentaje de ácido en la leche es de 0,3 a 1,2; la producción de CO_2 por azúcares es negativo; crecimiento en un cultivo de NaCl al 4% es positivo; crecimiento en un cultivo de Teepol al 0,4% es positivo; el grupo serológico es D.

La cepa 3 es un *Lactobacillus acidophilus*, por que cumple con las siguientes características; es una bacteria de forma bacilar, gram (+), catalasa (-), crece a una temperatura de 45ºC y fermenta principalmente los siguientes azucares Maltosa, Salicina, Sacarosa, Trealosa, Melibiosa, Amigdalina, Celobiosa y Rafinosa. (Sneath, P. 1986). Estas características concuerdan con Castillo, J. (2006), que además de describir las características de la cepa 3, manifiesta que el *Lactobacillus acidophillus* como regla general debe fermentar a la Rafinosa.

Con los datos obtenidos en el test API 50 CHL, sometidos a la interpretación por medio del software APILAB Plus versión 3.3.3 (bioMériux), la cepa 2 es un *Lactobacillus plantarum* con un 94.8%, con las siguientes pruebas en contra MLZ (Melezitosa) 92 % y TAG (D-tagatosa) 7 % y para la cepa 3 es un *Lactobacillus acidophilus* 54.7 % con las siguientes pruebas en contra: MAN (Manosa) 4%, TRE (Trealosa) 77 % y GEN (Gentiobiosa) 99%.

Este resultado difiere con lo obtenido por Beasley, S. (2004), que manifiesta haber identificado al *lactobacillus crispatus* en el TGI y excretas de aves de ceba. Probablemente por que esa identificación se realizo por procesos biomoleculares los cuales profundizan la identificación.

Existen aún pocos estudios científicos sobre el uso de estos microorganismos, estando realizados la mayoría de estos trabajos sobre aves de granja. Muchas de las conclusiones obtenidas en estas investigaciones se aplican a las aves de compañía, sin tener en cuenta que las condiciones de cría de unas y otras son muy distintas.

Actualmente está muy extendido el uso de probióticos en las aves de cría intensiva, fundamentalmente mezclado con el pienso, esto mejora notablemente sus producciones ya que evitamos los problemas derivados del consumo de antibióticos y otros quimioterápicos que se suministran a estos animales como prevención de infecciones y parasitosis. Los probióticos no curan por sí solos las enfermedades, pero ayudan a que las aves se recuperen antes y previenen algunos trastornos intestinales derivados de las terapias con antibióticos u otros quimioterápicos.

Los probióticos más conocidos entre los criadores y avicultores son los *Lactobacillus sp*, éstos forman parte de todos los probióticos existentes en el mercado, actúan produciendo ácido láctico a partir de lactosa por lo que disminuyen mucho el pH en la luz intestinal (inhibe crecimiento de bacterias patógenas de los géneros Salmonella, Proteus, Pseudomonas, Escherichia y otros), producen peróxido de hidrógeno (inhibe el crecimiento de gérmenes anaerobios y algunas especies como el *Lactobacillus acidophilus* produce vitaminas del grupo B. (Karín, L. 2004).

Entre los criterios utilizados para que un microorganismo sea considerado probiótico están: la capacidad de sobrevivir en su paso por el tracto gastrointestinal (tolerancia a la acidez y a la bilis), la capacidad de colonización del tracto gastrointestinal y propiedades relacionadas con la exclusión competitiva de patógenos. En este sentido el *Lactobacillus acidophillus* originario del TGI de pollo presenta mejores características de estabilidad frente a ácidos y bilis; este

microorganismo podría ser utilizado como productor de antimicrobianos en la industria láctica para disminuir el numero de casos de intoxicación alimentaria. Sin descartar también al *Lactobacillus plantarum*, proveniente del TGI de pollo, que presenta características no tan alejados del primero. (Karín, L. 2004).

El uso de un preparado probiótico a base de *Lactobacillus sp* de origen aviar en las pollitas de inicio del reemplazo de la ponedora comercial, causa un efecto benéfico significativo en los indicadores bioproductivos. (Ramirez, B. 2005).

C. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

1. Características Culturales: Las características macroscópicas definidas de las cepas de levaduras se determinan en el cuadro 9. Estas características nos acercan a la morfología propia de una especie de Levadura, pero no nos proporciona una identificación inicial de las colonias aisladas. Las características macroscópicas nos indican principalmente la capacidad de crecimiento de las levaduras en el medio, además de que el color de las colonias no indica ya una identificación previa y en casos certera como la levadura del genero *Rhodotorula* que manifiesta un color rojo anaranjado.

2. Tinción de Gram: Realizada esta prueba el resultado obtenido muestra que la cepa 3 es la única Gram (+). Por lo tanto las cepas 1, 1', 2, 2', 3', al demostrar ser Gram (-). (Cuadro 9). Probablemente gracias a las condiciones de crecimiento que brinda el medio Agar Extracto de Malta, sumada a la temperatura favorable, estos microorganismos encontraron un clima óptimo para su crecimiento. Se descartan por ser bacterias, hubo crecimiento de bacterias de genero y especie desconocida, pero al ser Gram (-), puede asociarse estos microorganismos a algunos que son patógenos e inclusive propios del hábitat de una excreta como la de ave, por los tanto estas cepas se descartan y desechan.

Generalmente las levaduras se comportan como Gram (+), esta técnica también nos sirve para determinar la morfología celular una vez vista al microscopio y determinar la formación de esporas, en este caso la cepa 3 no forma esporas.

Cuadro 9. CARACTERISTICAS CULTURALES DE LA IDENTIFICACION DE LEVADURAS.

	COLOR	TEXTURA	ELEVACION	TRASLUCIDES	FORMA	BORDES	TINCION GRAM	ESPORAS	FORMA CELULAR
CEPA 1	Crema-Blanca	Pastosa	Convexa	Opaca	Redonda	Regular	-	-	Bacilar
CEPA 1'	Crema-Amarilla	Pastosa	Plana	Transparente	Redonda	Regular	-	-	Bacilar
CEPA 2	Crema-Amarilla	Pastosa	Plana	Transparente	Redonda	Regular	-	-	Coco
CEPA 2'	Crema	Pastosa	Plana	Opaca	Redonda	Irregular	-	-	Bacilar
CEPA 3	Blanca	Seca	Convexa	Opaca	Redonda	Regular	+	-	Cilíndrica
CEPA 3'	Blanca-Crema	Seca	Plana	Transparente	Redonda	Regular	-	-	Coco

Fuente: Salas, M. (2008).

De esta manera se selecciona a la cepa 3, como una colonia de levadura y para realizar las siguientes pruebas complementarias y poder llegar a una posterior identificación.

3. Morfología: De acuerdo a la observación microscópica de la cepa 3 se avista la formación de seudomicelios sin percibirse formaciones de micelios, clamidosporas y ascosporas, como nos indica el gráfico 5. Sabiendo que la cepa 3 forma seudomicelios los géneros posibles son Candia, Pichia, Trichosporom, Schizosacharomyces, Cryptococcus. (Carrillo. L, 2002).

4. Utilización de Urea: La prueba determina que la cepa 3 es ureasa (+). Es decir es una levadura ureolítica, de acuerdo a este resultado la identificación se acorta aún mas siendo levaduras propias con esta característica las siguientes: Trichosporom, Schizosacharomyces, Cryptococcus. (Carrillo, L. 2002).

5. Presión Osmótica: Bajo las condiciones del medio para Presión Osmótica la cepa 3 reporta crecimiento como nos muestra el gráfico 6. Con este resultado se afirma que la cepa 3 es una levadura sin mostrar contundentemente aun una especie conocida.

6. Fermentación de Azúcares: El test API 20C aux demuestra los siguientes resultados como le muestra el cuadro 10. La cepa 3 fermenta los siguientes azúcares: D-Glucosa, Glicerol, 2-Keto-Gluconato, Arabinosa, Xylosa, Galactosa, D- Manosa, Celobiosa, Lactosa, Maltosa, Sacarolsa, Trealosa, Rafinosa, como indica el gráfico 7.

7. Asimilación de Azúcares: Mediante la técnica de Araujo se determino que los azúcares asimilados por la cepa 3 son los siguientes: Maltosa, Glucosa, Galactosa, Lactosa, Xilosa, Fructosa. El género Schizosaccharomyces no asimila Maltosa, pues la cepa 3 en estudio si lo hace de esta forma se descarte que sea este género. (Carrillo, L. 2002).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la lectura del perfil bioquímico de la galería api 20C aux, asimilación de azucares y las pruebas bioquímicas preliminares

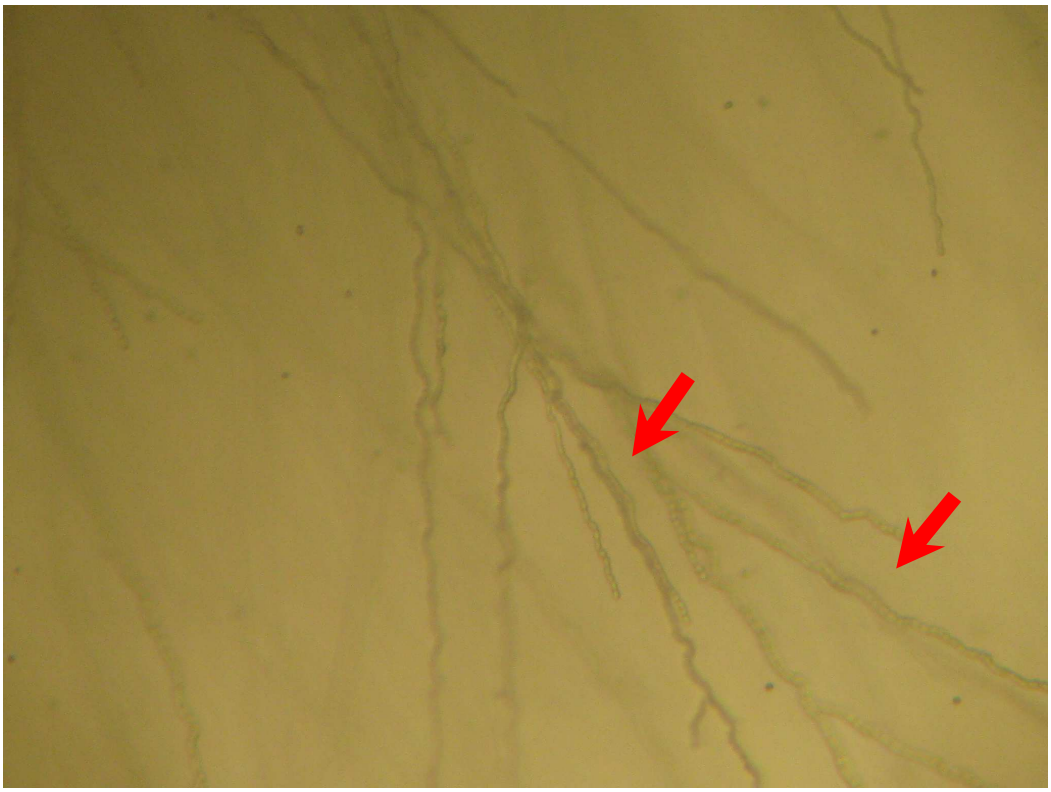


Gráfico 5. Formación de Seudomicelios cepa 3 Agar Malta (levaduras).

Gráfico 6. Crecimiento de la cepa 3 Agar Malta en el medio Presión Osmótica.

Cuadro 10. RESULTADOS FERMENTACIÓN DE AZÚCARES CEPA 3 AGAR MALTA (TEST API 20C AUX A 24 Y 48 HORAS).

Horas	0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO
24 h	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
48 h	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Horas	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF
24 h	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
48 h	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+

Fuente: Salas, M. (2008).

(-). Fermentación Negativa; (+) Fermentación Positiva.

Gráfico 7. Fermentación de Azúcares cepa 3 Agar Malta (test api 20C aux).

determinaron que la cepa 3, reúne características de levaduras del género, Trichosporom y Cryptococcus, principalmente esta levadura tiene una capacidad de fermentar un mayor número de azúcares, además de no asimilar Rafinosa, por estas razones la identificación de la cepa 3 se hace compleja. (Carrillo, L. 2002).

Con los datos obtenidos en el test API 20 C aux, sometidos a la interpretación por medio del software APILAB Plus versión 3.3.3 (bioMériux), la cepa 3 define dos posibles especies que pueden ser, *Cryotococcus humicolus* 78.9 % (0 en contra) y *Trichosporon mucoides* 20.1 % (0 en contra), al tener 0 en las pruebas contrarias no permite definir con seguridad a una de estas especies.

Por mostrar un comportamiento que no se conoce en la literatura citada se presume que la cepa 3 es un nuevo género de levadura, o al menos una nueva especie de los géneros mencionados.

Las levaduras de los géneros, Cryptococcus y Trichosporom, son asociadas a enfermedades en seres humanos. De ser de esta manera la cepa 3 se descartaría por no tener un potencial probiótico conocido.

Por ejemplo el *Cryptococcus neoformans,* agente causal de la criptococosis, que es una micosis sistémica de evolución subaguda o crónica, que ocupa el cuarto lugar entre las enfermedades oportunistas en pacientes con SIDA. En la Criptococosis también pueden implicar a la piel (como indica en el gráfico 8), pulmones, próstata, tracto urinario, ojos, miocardio, huesos y articulaciones. (Mendoza, M. 2005).

También se aisló de cabras con enfermedad pulmonar el género *Cryptococcus gattii*, este y la especie *Cryptococcus neoformans*, se ha dicho que el hábitat normal es las excretas de aves, principalmente de las palomas. (Mendoza, M. 2005).

Trichosporon es una levadura aislada del suelo, las muestras de agua, vegetales, mamíferos y aves. Además de ser un miembro de la flora normal de la boca, la piel y las uñas, es el agente causal de infecciones superficiales y profundas en los seres humanos.

Gráfico 8. Criptococosis a la piel.

Trichosporon spp. Son los agentes causantes de la piedra blanca y las infecciones superficiales trichosporonosis invasoras. Este hongo se ha convertido en una de hongos patógenos oportunistas. Son particularmente de riesgo para desarrollar la infección invasiva, que por lo general progresa rápidamente, con la participación de diversos órganos y sistemas, incluyendo los pulmones, riñones y bazo. Lesiones cutáneas como manifestación de la diseminación de la infección también es probable. *Trichosporon* es uno de los hongos aislados de pacientes con funguemia.

Es posible infectar prótesis valvulares, sistema nervioso central (incluyendo meningitis crónica), la córnea y el peritoneo (en pacientes que reciben diálisis peritoneal). Funguria benigno debido a *Trichosporon* puede observarse en pacientes con trasplante renal.

Especies asociadas a infecciones como *Trichosporon Cutaneum* y *Trichosporon asteroides* se asocian con las infecciones cutáneas superficiales; *Trichosporon ovoides* y *Trichosporon inkin* asociadas a la piedra blanca (cuero cabelludo) y piedra blanca (púbico) y los *Trichosporon asahii* (la mayoría) y Trichosporon mucoides sistémica trichosporonosis.

D. BANCO DE GERMOPLASMA

Las cepas aisladas e identificadas en la presente investigación son parte de la formación del “BANCO DE CEPAS DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DEL INSTITUTO DE CIENCIA ANIMAL”.

Las cepas de *Lactobacillus plantrum, Lactobacillus acidophilus* y la Cepa 3 Agar Malta, forman parte del banco de cepas que contiene 106 cepas totales, que pudiera utilizarse en la obtención de preparados microbianos, capaces de mejorar los procesos fisiológicos gastrointestinales en especies de animales monogástricos y procesos fermentativos en el rumen para especies poligástricas.

Los *Lactobacillus acidophilus y plantarum* tiene potencial probiótico probado en varias investigaciones, estas demuestran que al ser ingeridos ocurren cambios en la microflora intestinal que repercuten positivamente en la producción animal.

Esta función es la suma resultante de las diferentes actividades combinadas de los organismos que la conforman como lo son la fermentación de sustratos de la dieta no digeribles y del moco producido por el epitelio con la producción de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato), favoreciendo la recuperación y la absorción de calcio, hierro y magnesio, en la regulación del metabolismo de la glucosa, así como, la síntesis de la vitamina K y de las del grupo B. Algunos beneficios incluyen mejoría en las enfermedades infecciosas, y en seres humanos principalmente en enfermedades crónicas intestinales como colitis ulcerosa, inmunomodulación, biodisponibilidad de nutrientes, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus no insulinodependiente, obesidad, osteoporosis y cáncer. (González, B. 2003).

Las cepas potencialmente probióticas encontradas en el presente trabajo y otras cepas de distintos microorganismos del banco de cepas, se encuentran conservadas en tubos roll a 4°C, y tienen el 100% de viabilidad.

Las cepas encontradas y sumadas a otras existentes en este Banco de Cepas, deben ser sometidas a un estudio para realizar un preparado biológico probiótico, con el cual dichas cepas interactuaran entre si y con el medio intestinal de especies animales en estudio, de esta manera se determinara la actividad probiótica de estas cepas *in-vivo* lo cual proporcionaría la utilidad real de las cepas. Además se podrá llegar a comercializar como un biopreparado, como los existentes en el mercado como “Yea_sacc” de la casa Alltech o como el existente “LEVICA” de propiedad del Instituto de Ciencia Animal, Habana – Cuba.

V. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se desprenden en base a los resultados obtenidos son las siguientes:

1. La fermentación de excretas de aves de postura es una fuente de microorganismos con propiedades probióticas, principalmente de grupos beneficiosos como los *lactobacillus* y levaduras, por la rica microbiota que poseen en su tracto gastrointestinal.

2. Se aislaron 3 cepas del medio MRS e identificaron 2 cepas de *Lactobacillus*, *Lactobacillus plantrum y Lactobacillus acidophilus,* candidatos a probióticos a partir de excretas fermentadas de aves*.*

3. Se aislaron 6 cepas del medio Agar Extracto de Malta y se identificó 1 cepa de Levadura, la cual puede ser por sus características de uno de estos géneros Trichosporom o Cryptococcus*,* candidata a probiótico a partir de excretas fermentadas de aves*.*

4. La complejidad de la identificación de la Levadura se da por la fermentación de 13 azucares, que demuestra ser una levadura posiblemente en genero y especie desconocida.

5. Los *Lactobacillus plantrum, Lactobacillus acidophilus* y la Cepa 3 AM (Agar Malta), potencialmente probióticas, forman parte de las 106 cepas del BANCO DE CEPAS DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DEL INSTITUTO DE CIENCIA ANIMAL.

VI. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el aislamiento e identificación de *Lactobacillus* y Levaduras, de excretas de aves fermentadas con potencialidad probiótica, se puede realizar las siguientes recomendaciones.

1. Determinar las características probióticas de los aislados de *Lactobacillus* para su posterior evaluación y rendimiento en animales.

2. Realizar un preparado probiótico el cual nos permita evaluar los modos de acción con que actúan las cepas encontradas, además determinar las bondades de utilización con otros microorganismos potencialmente probióticos.

3. Realizar pruebas bioquímicas complementarias y pruebas biomoleculares que ayuden en la identificación de la cepa 3 Agar Malta (levadura), para lograr determinar su género y especie o en contra posición darle un nombre a esta levadura.

VII. LITERATURA CITADA

1. ANON, J. 1990. The Oxoid Manual. 6a ed. st. Hampshire, England. Edit. Unipath. p. 6
2. ANON, J. 2000. La gallinaza. ¿Un problema o un recurso económico? Revista Selecciones Avícolas. España. p. 265.
3. APAJALAHTI, J. Y KETTUNEN, A. 2002. Efecto de la dieta sobre la flora microbiana en el tracto gastrointestinal de aves. XVIII Curso de especialización FEDNA. 4-6 de Noviembre. Barcelona, España. pp. 41-51.
4. ATLAS, R. Y BARTHA, R. 1998. Interactions among microbial populations. Microbial Ecology. Fundamentals and Applications. 4a ed. Addison Wesley Longman, Inc. Menlo Park, California, USA. pp. 60-99.
5. BEASLEY, S. 2004. Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota. University of Helsinki, Finland. p. 7
6. BARNES, E. et al. 1972. The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria.
7. BAYDAN, E. Y YILDIZ, G. 2000. The problems caused of chicken feces and resolution. Lalahan Hay Arast Enst Derg. pp. 40:98.
8. BENGMARK, S. 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. pp. 18 - 26
9. BİTTENCOURT, J. et al. 2001. Colonização e efeitos no ecossistema digestivo de camundongos gnotobióticos de uma cultura comercial (BIOVICERIN®) de *Bacillus cereus.* Revista de Biologia e Ciências da Terra. pp. 14 - 24
10. BLAIR, R. 1974. Evaluation of dehydrated poultry wastes as a feed ingredient for poultry. Feed Proc. p. 35
11. BOCOURT, R. et al. 1998. Nota sobre la depuración biológica de *Escherichia coli* en la fermentación aeróbica de la excreta vacuna fermentada con caña molida. Revista Cubana Ciencia Agrícola. p. 64
12. BORRUEL, N. 2005. Interacciones de las bacterias de la flora con el sistema inmune intestinal. Tesis Dr. Medicina y Cirugía. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España. p 117.

13. CARRASCO, E. et al. 1996. Influencia del nivel de excreta vacuna en la fermentación en estado sólido de la caña de azúcar. Revista Cubana Ciencia Agrícola. pp. 54 - 69
14. CARRASCO, E. et al. 1997. Indicadores bromatológicos de la caña de azúcar fermentada con excreta vacuna y diferentes niveles de urea y grosores de la capa fermentativa. Revista Cubana Ciencia Agrícola. pp. 32 - 78
15. CARRASCO, E. et al. 1998. Nivel de urea y grosor de la capa en los indicadores fermentativos de la caña de azúcar procesada con excreta vacuna. Revista Cubana Ciencia Agrícola. p. 85
16. CARRILLO, L. 2002. Los hongos de los alimentos y forrajes. pp. 65 – 112
17. CASTILLO, J. 2006. Lactobacilos. Revista Selecciones de Microbiologia. Buenos Aires, Argentina. pp. 16 - 56
18. CASULA, G. Y CUTTING, S. 2002. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. Appl. Environ. Microbiol. p. 96
19. CORTES, J. 2002. Ensayos Microbiológicos, Prueba de Oxidasa. pp. 1-10
20. CORTSEN, L., LASSEN, M. Y NIELSEN, H. 1995. Small scale biogas digesters in Turiani, Nronga and Amani, Tanzania. A student report. Aarhus University, Denmark. pp. 145-165
21. DÍAZ, C. Y ELÍAS, A. 1976. Uso del ensilaje de excreta vacuna y miel final. 1 Efecto de diferentes niveles en dietas de miel final para puercos en crecimiento. Revista Cubana Ciencia Agrícola. pp. 32 - 45
22. DÍAZ, C., LEZCANO, P. Y ELÍAS, A. 1979. Uso del ensilaje de excreta vacuna y miel final en la alimentación porcina. 2 Sustitución de una dieta de maíz por ensilaje de excreta para puercos en crecimiento. Revista Cubana Ciencia Agrícola. pp. 19 - 56
23. DÍAZ, C. Y ELÍAS, A. 1983. Efectos de diferentes combinaciones de polvo de arroz y excremielaje en dietas con bajos niveles de miel para cerdos en ceba. Revista Cubana Ciencia Agrícola. pp. 86 - 94
24. DÍAZ, J., DÍAZ, C. Y ELÍAS, A. 1988. Nota sobre el uso de ensilajes de excreta de preceba porcina y miel final enriquecidos o sin enriquecer otros alimentos para cerdas gestadas. Revista Cubana Ciencia Agrícola. pp. 56 - 74

25. http://www.doctorfungus.com./03image/cryptococcus. 2000. McGinnis, M. Cryptococcus.
26. DONOVAN, D. et al. 2002. Growth and health of Holstein calves fed milk replacers supplemented with antibiotics or Enteroguard. Dairy Sci. p. 2
27. ENSMINGER, M. 1992. Management. Section 8. En The Stockman´s Handbook. Seventh Edition. Interstate Publishers, Inc. Danville, Illinois. p. 515.
28. EVERS, G.W. 1998. Comparison of broiler poultry litter and commercial fertilizer for Coastal Bermudagrass Production in the Southeastern US. J. Sustainable Agriculture. v. 12. p. 4.
29. FERKET, P., PARKS, C. Y GRIMES, J. 2002. Benefits of dietary antibiotic and mannanologosaccharide supplementation for poultry. Multi-State Poultry Meeting. May 14-16. Marriot Hotel, Indianapolis, Indiana, USA. p. 16
30. FERRER, B. Y DALMAU, J. 2006. Alimentos Funcionales Probióticos, Centro Atención Primaria de Alaquas, Sección Nutrición Hospital Infantil, Valencia, España. p. 51
31. FONS, M., GOMEZ, A. Y KARJALAINEN, T. 2000. Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract. Part 2: Bacteria/Bacteria Interactions. Microbial Ecology in Health and Disease. pp. 789 - 1162
32. FONTENOT, J.P. 1999. Nutrient recycling: The North American experience-Review. J. Anim. Sci. pp. 12 : 642.
33. FULLER, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. pp. 66 : 365 - 378.
34. FULLER, R. 1992. Chapter 1. History and development of probiotic. Probiotics. The Scientific Basic. Chapman & Hall, London, UK. pp. 1- 8.
35. GARCÍA, Y., ELÍAS, A. Y HERRERA, F.R. 2005. Dinámica microbiana de la fermentación *in vitro* de las excretas de gallinas ponedoras. Revista Cubana Ciencia Agrícola. pp. 14 - 156
36. GARLICH, J. 1999. Microbiología del tracto intestinal aviar. XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura. 24 de Septiembre. Lima, Perú. p. 45

37. GAUTHIER, R. 2003. Nuevas alternativas en terapéutica aviar. XVIII Congreso Latinoamericano de Avicultura. 7-10 de Octubre. Santa Cruz, Bolivia. pp. 23 - 57
38. GEDEK, B. 1989. Intestinal flora and bioregulation. Rev. Sci. 8(2):417-737.
39. GONZALEZ, B. et al. 2003. Bacteriocinas de Probióticos. Universidad Autónoma de Nuevo León. Mexico. pp. 14 - 124
40. GUARNER, F. Y SCHAAFSMA, G. 1998. Probiotics. Int. J. Food Microbiol. pp. 39 : 237 - 238.
41. GUARNER, F. 2002. El colon como órgano: hábitat de la flora bacteriana. Nutri. Hosp. XVII (Sup. 2). pp. 7-10.
42. HARDY, C. Y ELÍAS, A. 1974. Una nota sobre algunas características químicas del ensilaje de excreta/miel final *in vitro*. Revista Cubana Ciencia Agrícola. p. 165
43. HENRIQUEZ, M. 2005. Probióticos Legislación en Marcha. Madrid. España. p. 14
44. HIDALGO-GATO, G. et al. 1988. Producción y uso de biogas en instalaciones avícolas. Revista Cubana Ciencia Agrícola. Téc. Agrop. pp. 1145 - 1258
45. INAOKA, T. et al. 1999. Nutritive value of house fly larvae and pupae fed on chicken faeces as food source for poultry. Jap. Poult. Sci. pp. 36 : 174.
46. JADAMUS, A., VAHJEN, W. Y SIMON, O. 2001. Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. Arch. Anim. Nutr. pp. 54 : 1-17.
47. KALANTZOPOULOS, G. 1997. Fermented products with probiotic qualities. Anaerobe. 3. pp. 185-190.
48. KARÍN, L. et al. 2004. Estudio del potencial probiótico de lactobacilos aislados de fuentes naturales. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. España. p. 197
49. KELLEY, T. et al. 1996. Elemental concentration of stored whole and fractionated broilers litter. J. Appl. Poult. Res. 5. pp. 276 - 281.
50. KONTULA, P. et al. 1999. The effect of lactose derivates on intestinal lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 82. pp. 249 - 256.

51. LESSON, S. 2003. La producción de pollos parrilleros del futuro: desde la bioseguridad hasta el control de la contaminación. pp. 159
52. LILLEY, D. Y STILLWELL, R. 1965. Probiotics: growth promotion factor produced by microorganims. Science. 147. pp. 747 - 748.
53. LON WO, E. Y CÁRDENAS, M. 2003. Impacto económico y ambiental de una alimentación diferenciada para las gallinas ponedoras. Revista Cubana Ciencia Agrícola. p. 198
54. LU, J. et al. 2003. Evaluation of broiler litter with reference to the microbial composition as assessed by using 16S rRNA and functional gene markers. Appl. & Environmental Microbiol. 69(2). p. 901.
55. MACARI, M. Y MAIORKA, A. 2001. Aspectos fisiológicos da qualidade instestinal pré- e pós-eclosão e produtividade em frangos de corte. XXII Seminário Avícola Internacional. Amevea. Colombia. 7-9 de Marzo de 2001. pp. 46 - 57.
56. MACKIE, R. Y WHITE, B. 1997. Gastrointestinal Microbiology. Vol. 1. Gastrointestinal ecosystems and fermentations. Chapman & Hall Microbiology Series. New York, USA. p. 127
57. MACKIE, R., WHITE, B. Y ISAACSON, R. 1997. Gastrointestinal Microbiology. Vol. 2. Gastrointestinal microbes and host interactions. Chapman & Hall Microbiology Series. New York, USA. p. 142
58. MARRERO, Y. 2005. Las levaduras como mejoradoras de la fermentación ruminal de dietas con alto contenido de fibra. La Habana, Cuba. p. 6
59. MARSHALL, W. et al. 1998. Ceba ovina sobre la base de heno, miel-urea y suplementación con gallinaza. Digestibilidad y balance de N. Rev. Prod. Animal. 10. pp. 33-37.
60. MARSHALL, W. 2000. Contribución al estudio de la ceba ovina estabulada sobre la base de heno y suplemento proteíco con harina de soya y gallinaza. Tesis Dr. Cs. Vet. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. p. 14
61. MARTEAU, P. et al. 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine. Validation and the effects of bile. J. Dairy Sci. 80(6). pp. 1031-1037.

62. MARTIN, S., MCCANN, M. Y WALTMAN II, W. 1998. Microbilogical survey of Georgia poultry litter. J. Appl. Poult. Research 7. pp. 90-98.
63. MEJIA, J. 2001. Obtención de lactobacilos Su carecterización (invitro) como Potenciales prebióticas. Merida, Venezuela. p. 162
64. MENDOZA, R. 2001. Fermentación de las excretas porcinas y su reciclaje en la alimentación de cerdos. Tesis Dr. Cs. Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. pp. 148-163
65. MENDOZA, M. 2005. Importancia de la identificación de levaduras. Instituto de Biomedicina. Caracas. Venezuela. p. 17
66. METCHNIKOFF, E. 1907. The prolongation of life. Optimistic studies. Edit. Putnam & Sons, London. UK. p. 95
67. MOGUEL, Y. et al. 1995. Contenido de algunos macro y micro minerales en las deyecciones avícolas en Yucatán. Téc. Pec. Méx. pp. 100-104
68. NRC (NACIONAL RESEARCH COUNCIL). 1994. Nutrient Requeriment of Poultry. 9th rev. ed. National Academy Press, Washington, D.C. p. 16
69. ORTIZ, A. 2004. Evaluación de desechos de la industria cafetalera y azucarera como camas avícolas en Guantánamo y su aprovechamiento en la alimentación de ovinos. Tesis de Dr. Cienc. Vet. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. pp. 92-115
70. PACHECO, A. et al. 2003. Cuantificación del contenido de cobre y otros minerales en pollinazas producidas en el estado de Yucatán. p. 94
71. PARKER, R. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. Anim. Nutr. Health. 29. pp. 4-8.
72. PUGH, D. et al. 1994. Feeding broiler litter to beef catlle. Veterinary Medicine. p. 24
73. PÉREZ, M. 2000. Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica. Tesis Dr. Cs. Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. pp. 1-23
74. RAHE, A. 1915. Study of the so-called implantation of the *Bacillus bulgaricus*. J. Infect. Dis. 16. pp. 210-220.
75. RAMIREZ, B. et al. 2005. Evaluación del efecto probiótico del *Lactobacillus* spp. origen aviar en pollitas de inicio reemplazo de la ponedora

comercial en los primeros 42 días de edad. UNIVERSIDAD DE GRANMA. Cuba. p. 152

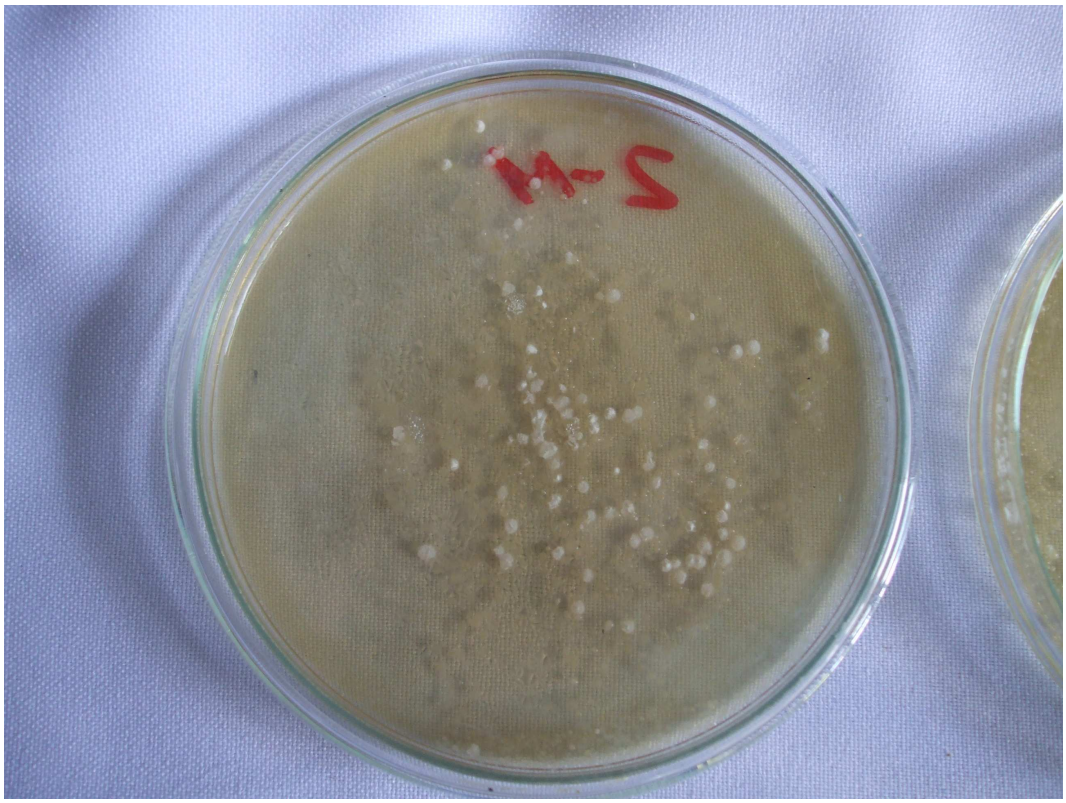
76. REID, G. 1999. Minireview: The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. Appl. Environ. Microbiol. 65(9). pp. 3763-3766.
77. ROBERFROID, M. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods. p. 32
78. Rodríguez, M. 2007. Pruebas de Identificación de Microorganismos. Bogota, Colombia. pp. 1-26
79. ROGOSA, M., MITCHELL, J. Y WISEMAN, R. 1951. A selective medium for the isolation of oral and faecal lactobacilli.J. Bacteriol. 62. pp.13-58.
80. ROMERO, R., ELÍAS, A. Y HARDY, C. 1977. Ensilaje de excreta de bovino y miel final en la ceba de pollos. 1 Altos niveles de sustitución del maíz por ensilaje suplementado con grasa y metionina o grasa y lisina. Revista Cubana Ciencia Agrícola. p. 75
81. ROSETE, A., GARCÍA, R. Y COTO, G. 1988. Variaciones en la composición bromatológica de la gallinaza con el tiempo de acumulación en la granja. Revista Cubana Ciencia Agrícola. p. 20
82. SALANITRO, J., BLAKE, I. Y MUIRHEAD, P. 1974. Studies on the cecal microflora of commercial broiler chickens. Appl. Microbiol. 28. p. 479
83. SALAZAR, B., MONTOYA, O. Y SEPÚLVEDA, J. 2005. Viabilidad de un aislado nativo de *Lactobacillus brevis* en una bebida láctea fermentada. Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN). Vol. 55, No. 4. Venezuela. p. 29
84. SAVAGE, D. 1980. Adherence of normal flora to mucosal surfaces. En: Bacterial Adherence. Beachey, E. H. Edit. Chapman & Hall, London, United Kingdon. pp. 1-62
85. SAVAGE, D. 1984. Present view of the normal flora. En: The germ-free animal in biomedical research. Coates, M.E. & Gustafson, B.E. Edit. Laboratory animals London. United Kingdon. p. 18
86. SAVAGE, D. 1987. Factors influencing biocontrol of bacterial pathogens in the intestine. Food Technol. 41. pp. 82-87.
87. SCHREZENMEIR, J. y de VRESE, M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics-approaching a definition. Colonia-Alemania. p. 51

88. SILVA, A. et al. 1999. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with Salmonella enteritis subsp. Typhimurium in conventional and gnotobiotic mice. J. Appl. Microbiol. 86. pp. 331-336.
89. SMITH, K.A. et al. 2001. A survey of the production and use of animal manures in England and Wales. II Poultry manure. Soil Use and Management. p. 16
90. SNEATH, P. et al. 1986. Bergey's Manual of Systetnatic Bacteriology. J.G. Holt editors. Baltimore MD. pp. 115-147
91. TABORDA, N., FLOREZ, V. Y GIRALDO, D. 2007. Pruebas Bioquímicas a Microorganismos. Caracas-Venezuela. p. 621
92. TANNOCK, G. 1997. Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental. R & D. Edit. TIBTECH. 15. pp. 270-274.
93. TERZICH, M. et al. 2000. Survey of pathogens in poultry litter in the United States. Edit. J. Appl. Poult. Res. 9. pp. 287-291.
94. TIQUIA, S . Y TAM, N. 2000. Fate of nitrogen during composting of chicken litter. Edit. Environ. Pollution. 110. pp. 535-541.
95. TOBEY, J. 1992. A current perspective: the utilization of microbial fermentation products in feed and forage. Proceedings of the International Roundtable on Animal Feed Biotechnology-Research and Scientific Regulation. Edit. Leger, D.A. & Ho, S.K. Agriculture Canada, Ottawa, Canada. pp. 1148-1256
96. UNIDAD DE PRODUCCIÓN AVÍCOLA, 2008. Dieta de Remplazo en Ponedoras y Aportes Nutricionales. Instituto de Ciencia Animal. La Habana-Cuba. p. 178
97. UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE. 2007. Pruebas Bioquimicas en Microorganismos. Facultad de Tecnología de Alimentos. pp. 57 - 85
98. UWE, R. Y SAINTMARTIN, R. 2007. Manual de Producción de Pollos Usando Microorganismos Efectivos. P. 564
99. van der WIELER, P. et al. 2000. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in boiler chickens during growth. Edit. Appl. Environ. Microbiol. 66(6). pp. 2536-2540.
100. WAHREN, M. 1990. Brot und Getreide in der Urgeschichte. In: Die ersten Bauern. Vol. 1 Schweizerisches Landesmuseum, Zurich. p. 147

ANEXOS

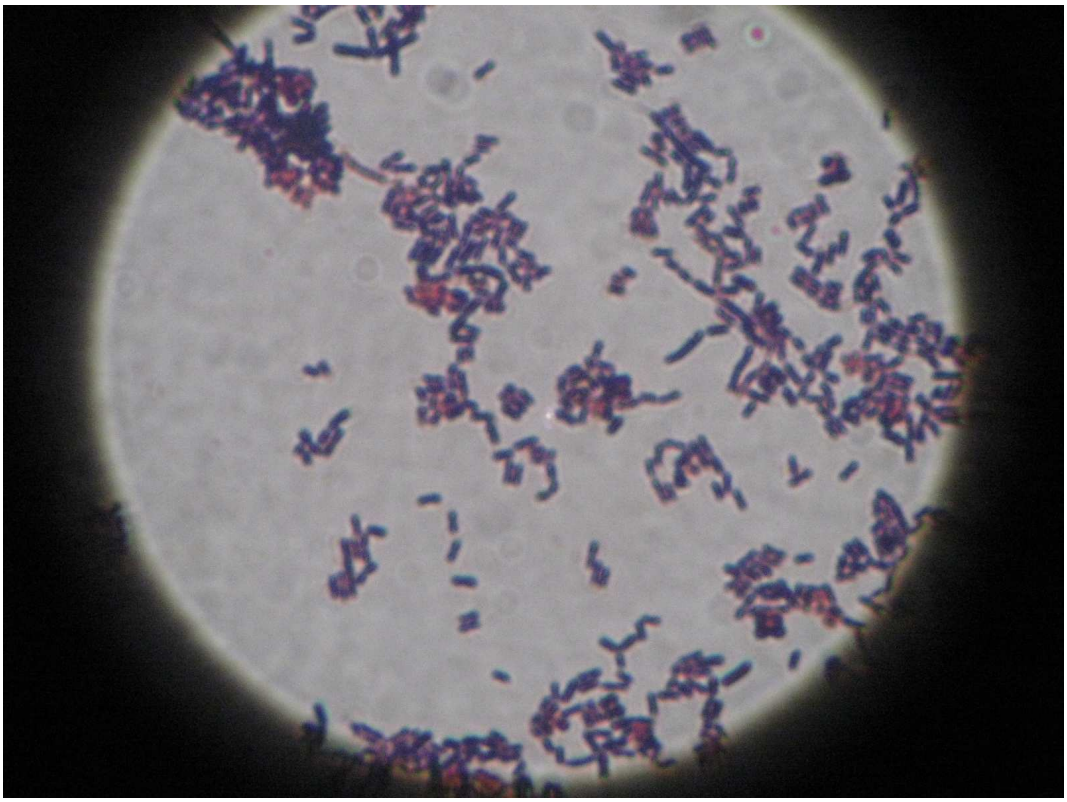
Anexo 1. Fotografía del proceso de fermentación de las excretas de aves (White Legorhn).

Anexo 2. Colonias de cepas de microorganismos aislados, medio de selección Agar Malta.

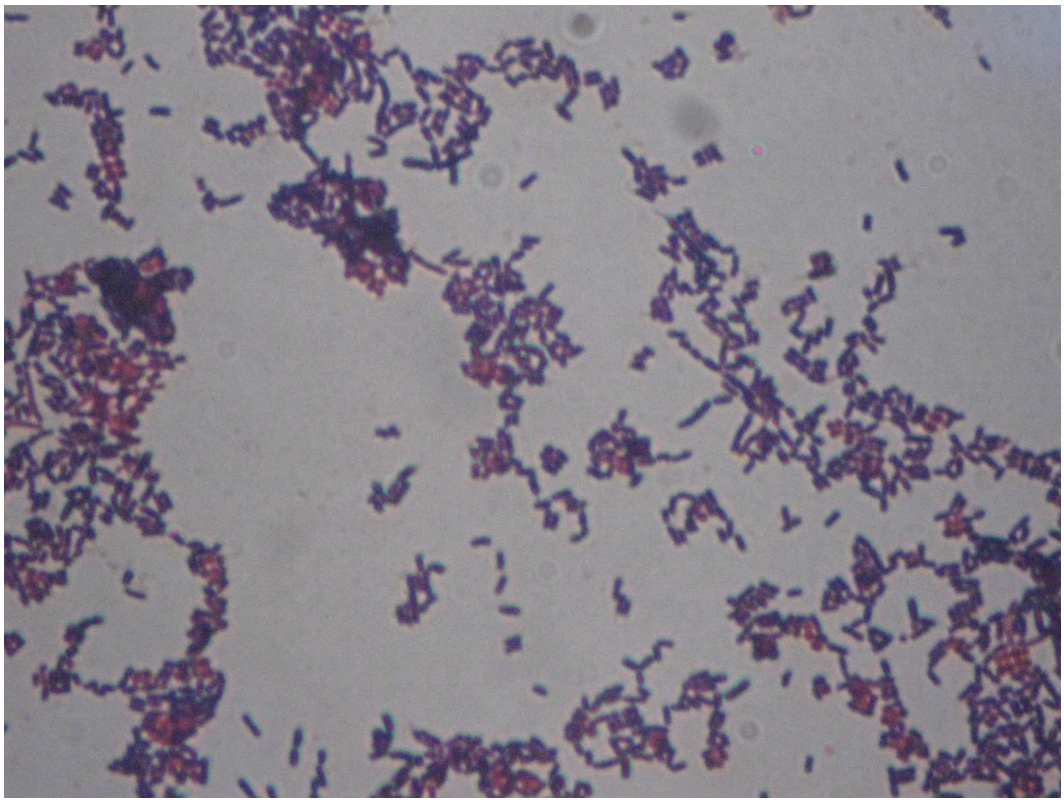


Anexo 3. Cultivo de la cepa de *Lactobacillus acidophillus* (cepa 3) y *Lactobacillus plantarum* (cepa 2), en aislados puros.

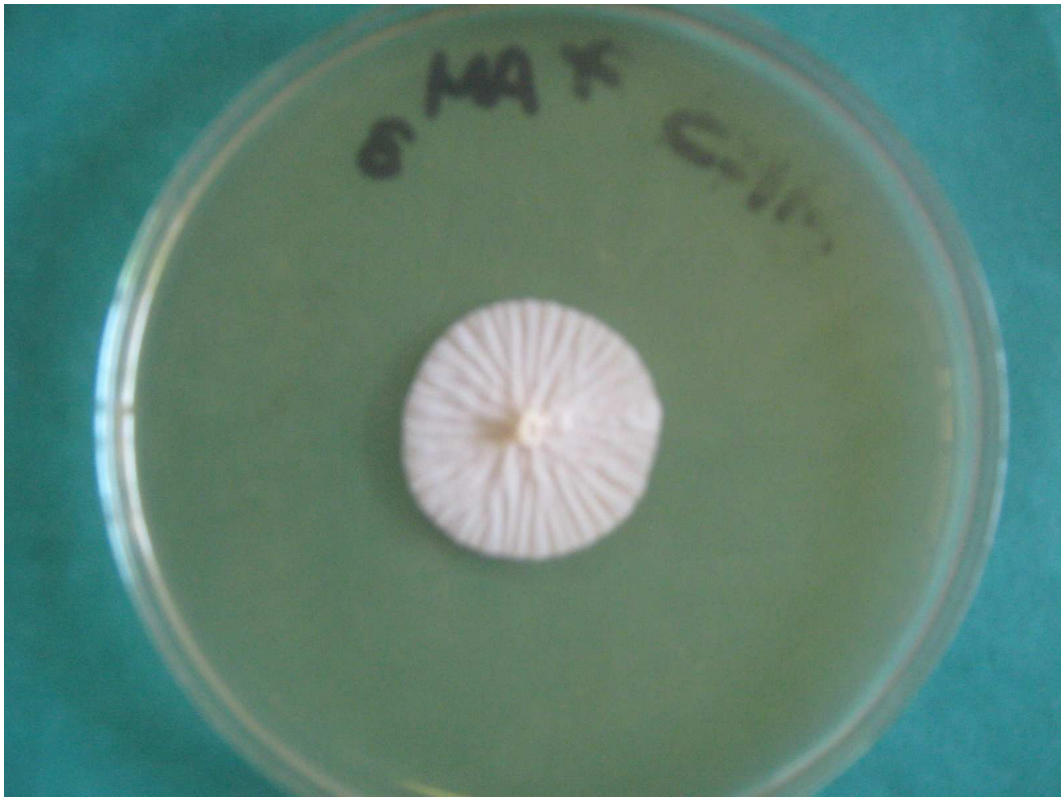
Anexo 4. Observación de *Lactobacillus plantarum*, al microscopio con el objetivo 40x, para observación de Tinción Gram.



Anexo 5. Observación de *Lactobacillus acidophillus*, al microscopio con el objetivo 40x, para observación de Tinción Gram.

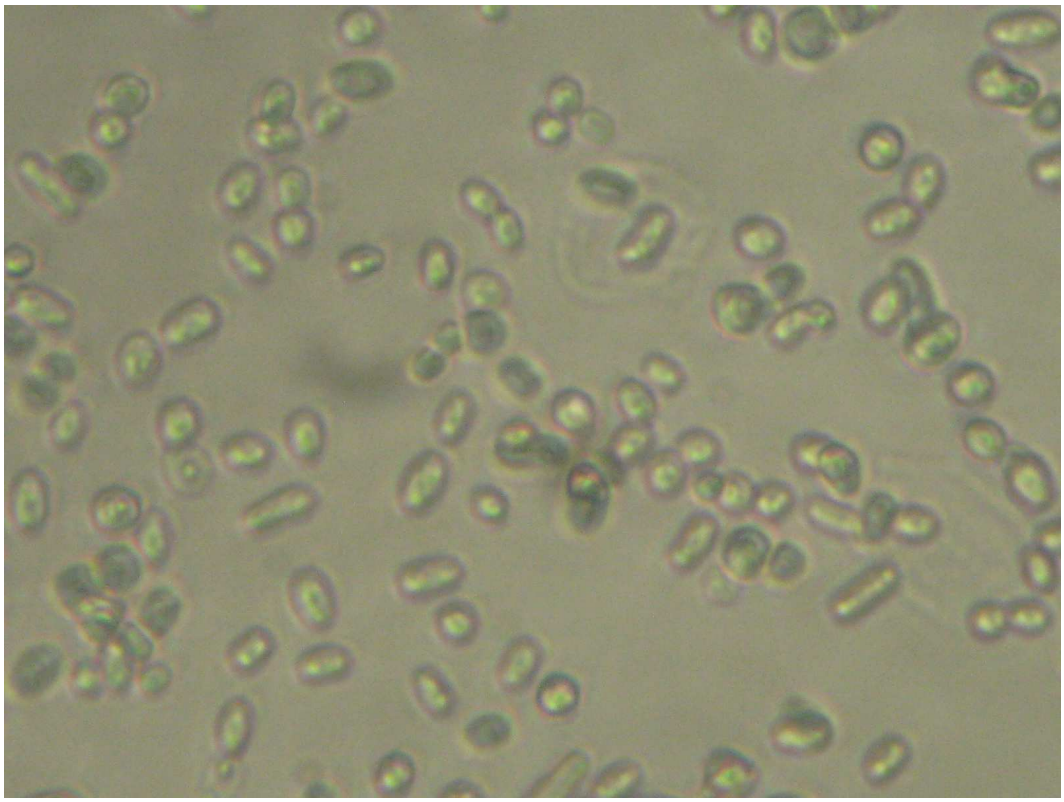


Anexo 6. Cepa 3 de Levadura, en aislado puro.

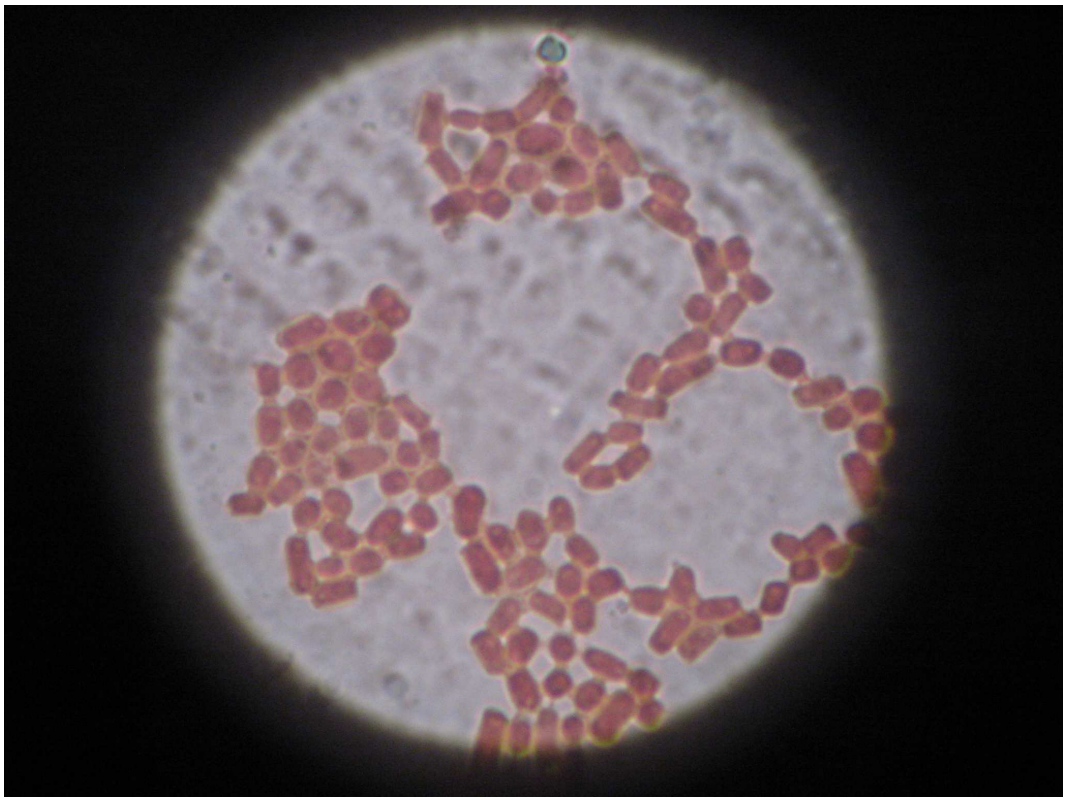


Anexo 7. Fotografía de tubos con la cepa 3 de Levadura en aislado puro, frente a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y cepa de *Candida sp*.

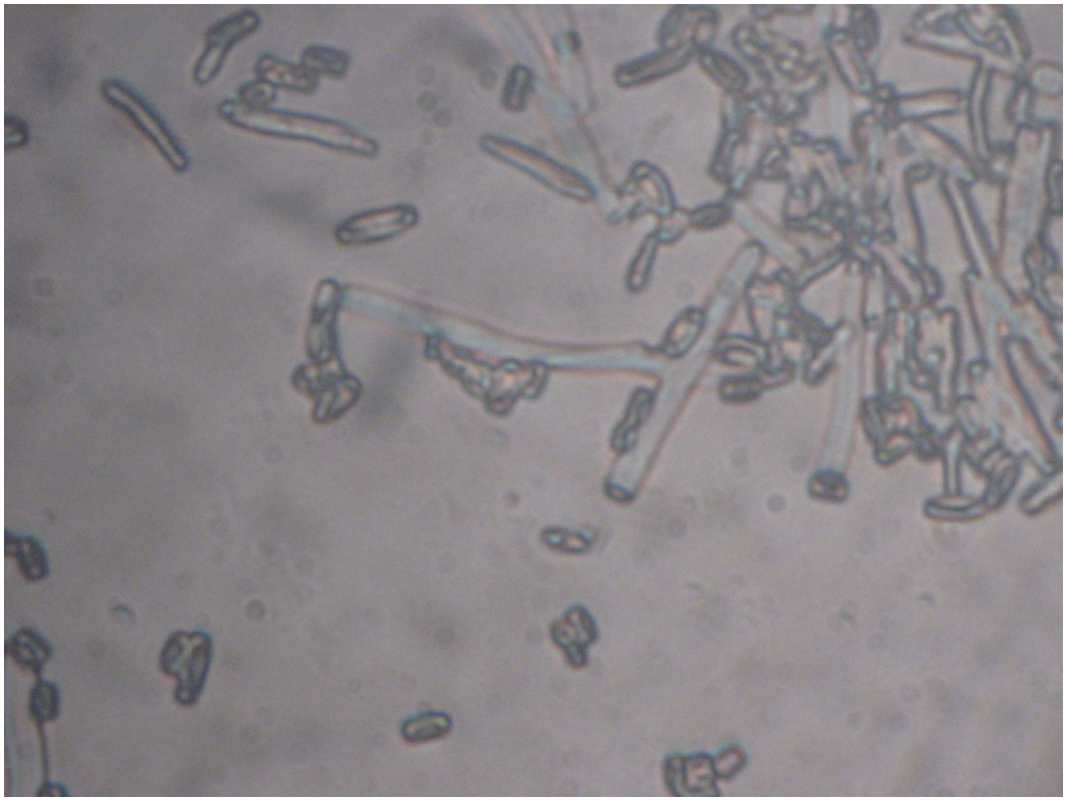
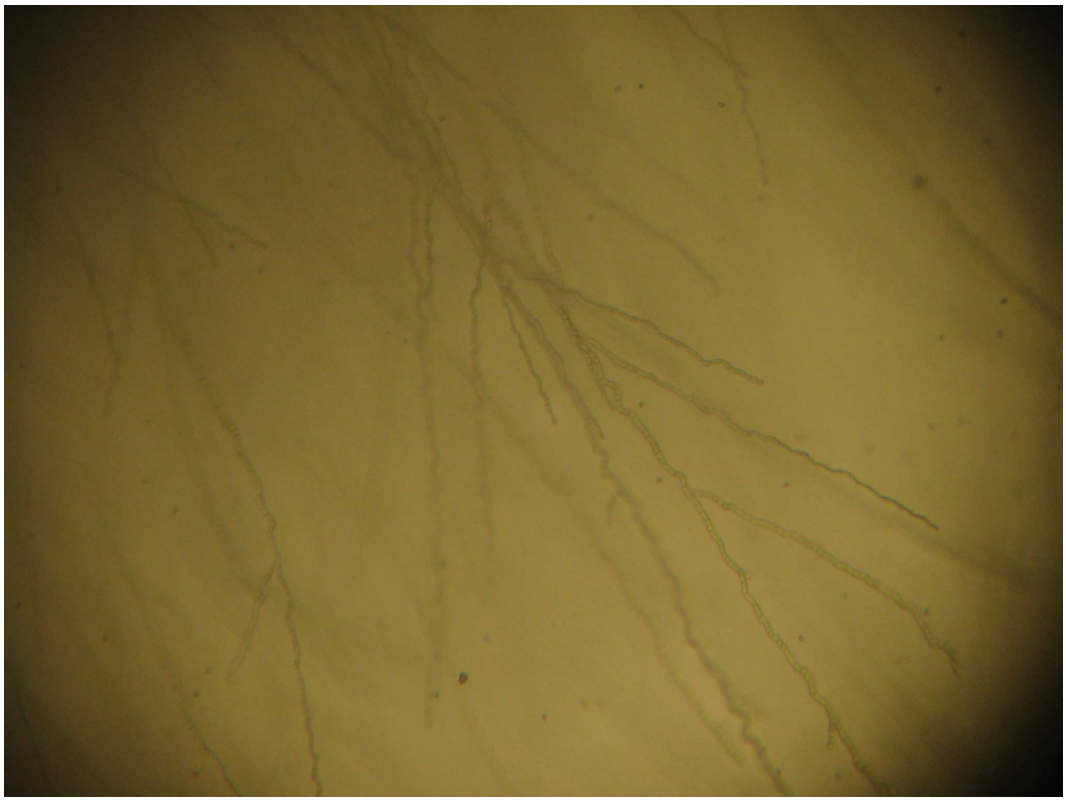
Anexo 8. Cepa 3 de Levadura vista al microscopio con aceite de cedro y el objetivo 40x.



Anexo 9. Cepa 3 de Levadura vista al microscopio para Tinción de Gram y el objetivo 40x.



Anexo 10. Cepa 3 de Levadura vista al microscopio para identificar, ascosporas, clamidosporas, micelios y seudomicelios, con el objetivo 40x.



Anexo 11. Cepa 3 de Levadura vista al microscopio identificando seudomicelios, con el objetivo 100x.