



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA

**“AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS DEL TRACTO
INTESTINAL DE *Gallus gallus* EN TRES ESTADÍOS FISIOLÓGICOS DE
POLLOS”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERO ZOOTECNISTA

AUTOR
WILSON FABIAN CHASI CHELA

RIOBAMBA – ECUADOR

2015

Este Trabajo de Titulación fue aprobado por el siguiente Tribunal

Ing. M.C. Enrique César Vayas Machado.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. M.C. Guillermo Xavier Mendoza Zurita.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ing. M.C. Luis Alfonso Condo Plaza.

ASESOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Riobamba, 31 de Julio de 2015.

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	v
Abstract	vi
Lista de Cuadros	vii
Lista de Gráficos	viii
Lista de Anexos	ix
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
II. <u>REVISIÓN DE LITERATURA</u>	3
A. MICROFLORA DEL TRACTO DIGESTIVO (AVES)	3
1. <u>Microorganismos del tracto digestivo de las aves</u>	3
B. PROBIÓTICO	8
1. <u>Funciones de los probióticos</u>	8
2. <u>Mecanismo de acción de los probióticos</u>	9
3. <u>Criterios de selección para las cepas Probióticas</u>	10
C. MICRORGANISMOS DESTINADOS COMO PROBIÓTICOS	12
1. <u>Lactobacillus</u>	14
2. <u>Las Bifidobacterias</u>	16
D. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS	16
E. PRUEBAS DE MICROBIOLOGÍA	16
1. <u>Pruebas de identificación</u>	17
2. <u>Repuesta Bioquímica</u>	20
3. <u>Análisis de Virulencia</u>	20
III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	21
A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO	21
1. <u>Condiciones Meteorológicas</u>	21
B. UNIDADES EXPERIMENTALES	21
C. MATERIALES, EQUIPOS, E INSTALACIONES	22
1. <u>Materiales</u>	22
2. <u>Reactivos y medios de cultivo</u>	22
3. <u>Equipos</u>	23
4. <u>Instalaciones</u>	23
D. TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL	23

E. MEDICIONES EXPERIMENTALES	24
1. <u>Respuesta Morfológica</u>	24
2. <u>Repuesta Bioquímica</u>	24
3. <u>Análisis de Virulencia</u>	24
F. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA	24
G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	25
1. <u>Obtención de muestras</u>	25
2. <u>Procedimiento microbiológico</u>	25
H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN	28
1. <u>Respuesta Morfológica</u>	28
2. <u>Repuesta Bioquímica</u>	28
3. <u>Análisis de Virulencia</u>	28
IV. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	29
A. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA MORFOLÓGICA DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS	29
1. <u>Morfología de la colonia</u>	29
2. <u>Morfología individual</u>	29
3. <u>Unidades formadoras de colonia UFC/ml</u>	29
4. <u>Características tintoriales</u>	31
B. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA BIOQUÍMICA DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS	32
1. <u>Prueba de catalasa</u>	33
2. <u>Prueba de acidez</u>	33
3. <u>Producción de gas</u>	35
4. <u>Producción de H₂S</u>	38
5. <u>Movilidad</u>	40
C. ANÁLISIS DE VIRULENCIA DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS	40
1. <u>Actividad hemolítica</u>	40
2. <u>Capacidad de coagulación de la leche</u>	41
V. <u>CONCLUSIONES</u>	43
VI. <u>RECOMENDACIONES</u>	44
VII. <u>LITERATURA CITADA</u>	45
ANEXOS	

RESUMEN

En el LABIMA de la Facultad de Ciencias Pecuarias se aisló microorganismos probióticos del tracto intestinal (colon y ciego), de pollos en tres estados fisiológicos inicial, crecimiento y engorde, con el fin de obtener cepas probióticas autóctonas que pueden ser utilizados en la misma especie. El experimento tuvo una duración de 120 días, las unidades experimentales fueron distribuidas bajo un sistema de aleatorización de cada uno de los tractos digestivos de los pollos, mismos que fueron analizados bajo el método estadístico Chi Cuadrado, se aislaron e identificaron los microorganismos probióticos pertenecientes al género *Lactobacillus*, usando metodología basada en criterios de identificación mediante la caracterización morfológica, pruebas bioquímicas y de virulencia. Los principales resultados que se obtuvieron con las características morfológicas de las colonias fueron homogéneas, regulares, convexas de aspecto cremosa, de las 72 muestras en estudio, en la morfología individual se observaron bacilos y cocos, Gram positivos a excepción de dos y tres unidades experimentales en la fase inicial y crecimiento respectivamente. Las cepas fueron sometidas a pruebas bioquímicas como catalasa, acidez, producción de gas, producción de H₂S y movilidad, obteniendo resultados favorables, ya que la mayoría presentó las características propias de género *Lactobacillus*, producción de ácido a partir de glucosa son usualmente positivos a excepción de algunas especies; catalasa, producción de gas, H₂S y movilidad negativo en la mayoría de las muestras; de todos los cultivos 24 presentaron actividad hemolítica y todos los cultivos del género de *Lactobacillus* poseen capacidad de coagulación de la leche. Concluyendo que el tracto intestinal de *Gallus gallus* constituye una importante fuente natural para el aislamiento de *Lactobacillus* con características probióticas.

ABSTRACT

In the LAB of the faculty of Animal Science, it was isolated the microorganisms of the intestinal tract (colon and cecum), of chickens in three physiological stages: initial, growth and fattening, with the purpose of obtaining probiotic strains, such as that can be used in the same species. The experiment lasted 120 days, the experimental units were distributed in a system of randomization of each one of the digestives tracts of the chickens, same that were analyzed under the statistical method, Chi Square, were isolated and identified the probiotic microorganisms that belonging to the genus *Lactobacillus*, using the methodology based on criteria of identification by morphological characterization, biochemical tests and virulence. The main results that were obtained with the morphological characteristics of the colonies were homogeneous, regular, convex and creamy appearance, the 72 studied samples, in the single morphology, bacilli and cocci were observed. Gram positives except two and three experimental units in the initial stage and growth respectively. The strains were subjected to biochemical tests as catalase, heartburn, gas production, production of H₂S and mobility, obtaining favorable results, since the majority presented the characteristics of gender *Lactobacillus*, acid production from glucose are usually positive except for some species catalase, H₂S gas production and negative mobility in most samples of all 24 crops, they presented hemolytic activity and all crops of the genus *Lactobacillus*, have the capacity to milk clotting. Concluding that the intestinal tract of *Gallus gallus*, is an important natural source for the isolation of *Lactobacillus* with probiotic characteristics.

LISTA DE CUADROS

Nº		Pág.
1	DIFERENCIA ENTRE EUBIOSIS Y DISBIOSIS.	6
2	MICROORGANISMOS UTILIZADOS COMO PROBIÓTICOS FRECUENTEMENTE.	13
3	OTROS MICROORGANISMOS UTILIZADOS COMO PROBIÓTICOS.	13
4	CONDICIONES METEOROLÓGICAS DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA ANIMAL.	21
5	RESUMEN DEL ADEVA.	30
6	SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY AL 5%	31
7	RESPUESTA BIOQUÍMICA Y DE VIRULENCIA DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EN EL CIEGO Y COLON DE POLLOS EN INTERACCIÓN CON LA FASE INICIAL, CRECIMIENTO Y ENGORDE.	32
8	RESPUESTA BIOQUÍMICA Y DE VIRULENCIA DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EN EL CIEGO Y COLON DE POLLOS SACRIFICADOS EN LA FASE INICIAL, CRECIMIENTO Y ENGORDE.	35
9	RESPUESTA BIOQUÍMICA Y DE VIRULENCIA DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EN EL CIEGO Y COLON DE POLLOS SACRIFICAOS EN LA FASE INICIAL, CRECIMIENTO Y ENGORDE.	37
10	ANÁLISIS DE LAS RESPUESTAS BIOQUÍMICAS Y DE VIRULENCIA DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EXTRAÍDOS DEL CIEGO Y COLON DE POLLOS SACRIFICAOS EN LAS FASES INICIAL, CRECIMIENTO Y ENGORDE.	39

LISTA DE GRÁFICOS

Nº		Pág.
1	Tracto gastrointestinal de las aves.	4

LISTA DE ANEXOS

- Nº
- 1 Resultado microbiológico del aislamiento de microorganismos probióticos de pollos en tres estados fisiológicos.
 - 2 Resultados obtenidos de las Unidades Formadoras de Colonias UFC/mlX10⁸, por regiones y en los diferentes estadíos fisiológicos de pollos.
 - 3 Cultivo de la cepa de *Lactobacillus* puros.
 - 4 Imagen de *Lactobacillus*, al microscopio con el objetivo 40x, para observación de Tinción Gram. (A1B1).
 - 5 Evaluación de producción de gas y producción de ácido a partir de la glucosa.

I. INTRODUCCIÓN

La avicultura moderna, caracterizada por una explotación intensiva, no está exenta de factores causantes de desequilibrios en los animales. La alta densidad de población, vacunación, altas o bajas temperaturas, humedad inadecuada, incidencia de gases tóxicos, alta carga de microorganismos patógenos e inmunodepresiones, son algunas de las problemáticas causantes de altos niveles de estrés en las aves. Estas constantes situaciones traen consigo la aparición frecuente de diversas enfermedades y la disminución de los niveles de producción de las aves.

Por tales razones, es importante investigar dentro de las prácticas de alimentación de los animales, la introducción de diferentes productos biológicos que contrarresten los efectos negativos anteriormente citados.

Los probióticos son productos naturales que utilizados como promotores del crecimiento en los animales permiten obtener mayores rendimientos, más elevada resistencia inmunológica y reducida cantidad de patógenos en el tracto gastrointestinal. Estos microorganismos beneficiosos, son la primera línea de defensa del cuerpo contra los microorganismos potencialmente dañinos que se inhalan o se ingieren.

Es un suplemento alimenticio que beneficia la salud del organismo del hospedero, generalmente es considerado que llevan a cabo un mejoramiento en el balance microbial. Sin embargo cada vez es más claro el beneficio que tiene los probióticos en la salud.

El tracto gastrointestinal cumple varias funciones tales como la absorción y digestión de nutrientes, existe una compleja mezcla de microorganismos de tipo endógena y la otra compuesta por microorganismos que potencialmente pueden comportarse como patógenos. Un elemento clave en la defensa del sistema digestivo es la microflora endógena. Las bacterias benéficas compiten con los patógenos por los sitios de adhesión y por nutrientes.

Es por ello que se necesita de nuevos enfoques para limitar la concentración de patógenos en el tracto gastrointestinal, obteniendo nuevas cepas autóctonas, que provengan del tracto gastrointestinal de la misma especie para las cuales van a ser usadas.

Por lo tanto, la presente investigación tuvo como objetivos:

1. Aislar microorganismos del tracto intestinal de *Gallus gallus* con potencial probiótico de las regiones del ciego y colon en tres diferentes estadios fisiológicos de pollos.
2. Establecer la región del tracto digestivo que aporta una mayor producción de microorganismos con carácter probiótico.
3. Determinar el estado fisiológico de *Gallus gallus* más adecuado para la producción de microorganismos con poder probiótico.
4. Caracterizar morfológicamente y bioquímicamente los microorganismos aislados del tracto intestinal.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. MICROFLORA DEL TRACTO DIGESTIVO (AVES)

Para mantener la salud de los animales es importante mantener equilibrada la microflora intestinal, para lograr una alta utilidad productiva. Una forma de defensa contra patógenos entéricos es mantener la microflora saludable, por ende, es necesario mantener alto los niveles de esta microflora. También es indispensable para la adecuada digestión de los nutrientes, en la absorción de estos nutrientes juega un papel fundamental el intestino, ya que es considerado inmunológico o defensor contra los patógenos invasores. (Mohnl, M. 2011).

La microflora intestinal comprende todas las bacterias, protozoos y hongos presentes en el tracto gastrointestinal y consiste en aproximadamente 400 a 500 especies diferentes. En los animales monogástricos se pueden encontrar aproximadamente 1014 especies diferentes de microorganismos, inicialmente el tracto digestivo se encuentra estéril, el mismo que es colonizado rápidamente por microorganismos después del nacimiento. (Mohnl, M. 2011).

1. Microorganismos del tracto digestivo de las aves

Las aves cada vez son más susceptibles a cualquier estrés por mínimo que sea y sobre todo a la hora de conseguir la capacidad total de rendimiento de su flora intestinal. Las nuevas formas de manejo zootécnico, en aves genéticamente avanzadas y en el engorde de broilers es debido a los distintos avances tecnológicos que se han ido desarrollando en la industria avícola. (Cabrera, O. 2014).

A continuación se muestra el tracto gastrointestinal de las aves (gráfico 1).

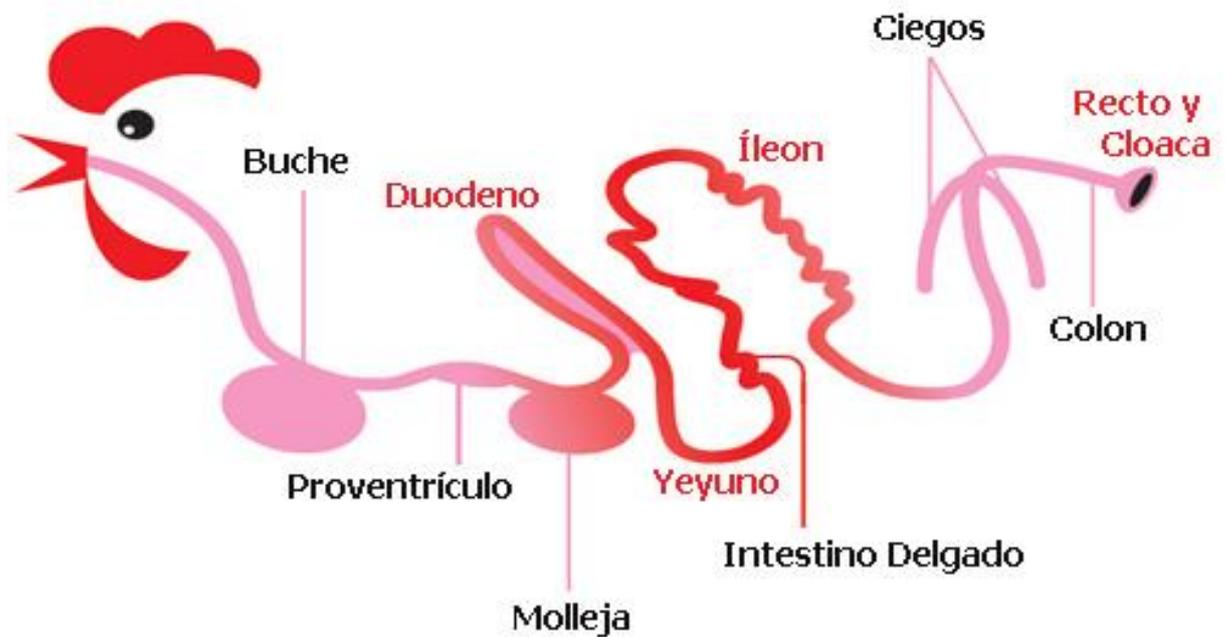


Gráfico 1. Tracto gastrointestinal de las aves.

El grupo de microorganismos localizados en el intestino se los denomina de varias formas: flora intestinal, bacterias amigables, microbiota intestinal. Está formada principalmente por bacterias, hongos y virus, se menciona que las bacterias superan el número de células del huésped (ave) en aproximadamente 10 a uno; las nuevas tecnologías basadas en el ADN aportan datos más precisos de los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal que aún no están clasificadas, es decir son desconocidas, (Cabrera, O. 2014). Estudios recientes enfocados en las aves exponen que el tracto gastrointestinal de un pollo está habitado por aproximadamente de 640 especies de bacterias, la diversidad y abundancia de la microflora varía a lo largo del tracto gastrointestinal, (Cabrera, O. 2014).

a. El Intestino

En condiciones normales el intestino representa el 5% del peso vivo de las aves, las aves utilizan aproximadamente el 30% del oxígeno consumido para su

mantenimiento, el 20% de energía proporcionada por la dieta, 25% de la síntesis diaria de proteínas se producen en el intestino (Satefanoviciaus, M. 2013)

En el intestino en condiciones anormales (enfermedad o desequilibrio) el consumo de recursos crece sustancialmente, aunque también existe una reducción de la absorción de los nutrientes que es otro factor agravante. Estas son los factores principales en las que se debe poner énfasis para cuidar la salud gastrointestinal de los animales de granja. (Satefanoviciaus, M. 2013).

b. Importancia de la microflora intestinal

- Los microorganismos aumentan en número y diversidad desde el intestino delgado hasta el ciego. (Satefanoviciaus, M. 2013).
- La microflora se subdivide en flora principal, satélite y residual.
- La flora principal se compone esencialmente de especies anaerobias (*Bifidobacterias*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* y *Eubacterium*) que producen ácido láctico y otros ácidos grasos de cadena corta. La flora satélite representa aproximadamente el 1% está compuesta principalmente de los enterococos y *E. coli*. La flora residual es inferior a 0,01% y su composición son básicamente bacterias patógenas.
- El desarrollo de un microflora intestinal beneficiosa es necesario que se establezca lo más pronto posible. El intestino de un pollito cuando nace es como un libro en blanco, quién llega primero, primero escribe. Si es un organismo benéfico, es él quien hará su labor, pero si es un patógeno, la labor será diferente. (Satefanoviciaus, M. 2013).

c. Funciones de la microflora intestinal

- Digestión y absorción de nutrientes (producción de vitaminas en los ciegos).
- Metabolismo de xenobióticos y toxinas endógenas.
- Inhibición directa de patógenos.
- Función epitelial.
- Acción sobre el sistema inmunitario del intestino.

El órgano linfoide de las aves es el intestino (Satefanoviciaus, M. 2013).

d. Eubiosis – Disbiosis

En un animal sano la población de bacterias que viven en el intestino está en "equilibrio" (el número de "bacterias buenas" supera el número de "bacterias malas"). En esta situación diremos que las aves están en Eubiosis, lo contrario de esto se denomina Disbiosis, como muestra el cuadro 1. (Satefanoviciaus, M. 2013).

Cuadro 1. DIFERENCIA ENTRE EUBIOSIS Y DISBIOSIS.

Eubiosis	Disbiosis
Protección del intestino	Daño en el epitelio intestinal
Efecto antagonista para microorganismos no deseados	Producción de metabólicos tóxicos (NH ₃ , aminas biogénicas)
Función epitelial	Aumento de la producción de gas
Maduración y modulación del sistema inmune del huésped	Debilitamiento del sistema inmune
Buena digestión y absorción de nutrientes	Renovación celular acelerada → aumento de la demanda de energía
Síntesis de vitaminas	
Síntesis de proteínas	

Fuente: Satefanoviciaus, M. (2013).

La disbiosis puede tener un impacto negativo sobre el hospedero animal. Los microorganismos patógenos normalmente se encuentran a niveles bajos, al incrementarse drásticamente el número de patógenos, las toxinas que están producen llegan a ser peligrosas para el huésped. (Mohnl, M. 2011).

e. Posibles razones porque la eubiosis cambia a disbiosis

- Cambios sustanciales en la dieta.
- Baja calidad de los compuestos de los alimentos.

- Higiene alimentaria insuficiente.
- Transporte
- Sobrepoblación
- Clima
- Enfermedad
- Vacunación (Satefanoviciaus, M. 2013).

La nutrición es el principal factor que influye en la composición y actividad metabólica de la microflora intestinal. Los factores que comprometen a la eubiosis son la baja calidad de los ingredientes, cambios dietéticos a los animales y la mala higiene alimenticia. (Mohnl, M. 2011).

El cambio de una dieta con baja concentración de proteína a una dieta con alta concentración de proteína favorece el crecimiento de ciertas bacterias como los *Clostridium* y reduce las condiciones apropiadas para los *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*. Además, cada tipo de estrés puede tener un impacto directo sobre la microflora intestinal, ya que este influye en la liberación de secreciones digestivas y el tipo y frecuencia de los movimientos intestinales (peristalsis). (Mohnl, M. 2011).

Cuando los animales presentan disbiosis o enfermedad, gastan gran cantidad de energía para tratar de reparar el tracto gastrointestinal, en cambio cuando el animal está completamente sano el gasto de energía del sistema inmune es menor como consecuencia hay mayor cantidad de energía disponible para el desarrollo del animal, (Satefanoviciaus, M. 2013).

Para asegurar un óptimo crecimiento animal es indispensable que el tracto gastrointestinal este sano ya que es un requisito previo para los sistemas avícolas modernos. El actual modelo de producción (manejo, nutrición, genética, etc.) es extremadamente estresante para los animales, por tal motivo, es necesario producir aves con promotores de crecimiento. (Satefanoviciaus, M. 2013).

B. PROBIÓTICO

Un probiótico es una preparación que contiene microorganismos definidos, viables y en cantidades suficientes, que alteran uno de los compartimentos de la microflora del huésped mismos que ejercen beneficios para la salud. Se ha demostrado que la administración de probióticos no sólo repercute en el intestino, sino en todo el organismo, especialmente en los sistemas inflamatorio e inmunitario. (Farías, M. 2011).

Los probióticos son una buena alternativa, natural y sin efectos secundarios para mejorar el funcionamiento intestinal y optimizar la salud, la misma que es perjudicada o afectada por el estrés, los malos hábitos alimentarios y el abuso de antibióticos, (Barreda, P. 2009).

1. Funciones de los probióticos

Los probióticos son considerados “alimentos funcionales”, en otras palabras, alimentos enriquecidos que aportan beneficios y mejoran la salud del animal. Tanto probióticos, como prebióticos, además de nutrir al animal, colonizan el intestino modificando favorablemente la flora intestinal y mejora el funcionamiento del sistema inmune. (Rojó, J. 2005).

Por tanto, estas bacterias tienen también propiedades inmunomoduladoras, ya que estimulan la producción de anticuerpos y refuerzan el sistema inmune. Cuando estos probióticos son ingeridos por el animal, gracias a su elevada concentración los microorganismos se encargan de poblar el intestino de flora útil y homogénea, estas bacterias fundamentalmente producen ácido láctico, garantizando un pH bajo en el intestino, en el cuál los patógenos (coliformes, salmonellas, Staphylococcus y Gram negativos en general) no tienen capacidad de desarrollarse. Por la competencia biológica y la capacidad de acidificar el medio, las bacterias presentes en el probiótico primero evacuan y luego impiden una nueva formación de patógenos. (Hamer, R. 2010).

a. Nutritiva

Mejoran el proceso normal de la digestión, incrementando la absorción de minerales (entre ellos el calcio, lo que es interesante para evitar la osteoporosis), la producción de vitaminas (sobre todo las de tipo B, como niacina, ácido fólico, biotina y vitamina B6), y la recuperación de componentes valiosos (como los ácidos grasos de cadena corta). La fermentación bacteriana produce ácidos grasos de cadena corta que aportan energía al organismo, produce metabolitos como vitaminas (K, algunas del complejo B) así como enzimas digestivas y favorece la absorción de minerales. (Guarner, F. 2007).

b. Trófica

Acelera el paso gastrointestinal, aumenta la velocidad de renovación de los enterocitos e Incrementa la reabsorción de agua. (Guarner, F. 2007).

c. Defensiva

La mucosa intestinal constituye la mayor superficie del organismo expuesta al exterior, y el tracto gastrointestinal es el órgano más rico en células inmunes. La pérdida del equilibrio entre la cantidad de bacterias "beneficiosas" y "nocivas" de la microbiota intestinal conlleva al desarrollo de infecciones y/o enfermedades inmunoinflamatorias. La simbiosis de la flora bacteriana se puede mejorar mediante el uso de fármacos o nutrientes elaborados en base a probióticos, ya que estos disminuyen el pH, eleva la capacidad redox, sirve como barrera y combate con bacterias patógenas gracias a que producen sustancias antimicrobianas conocidas también como bacteriocinas. (Guarner, F. 2007).

2. Mecanismo de acción de los probióticos

Capacidad de adhesión de probióticos en los receptores del epitelio intestinal, es decir que las bacterias probióticas luchan con las bacterias patógenas por un lugar en la pared intestinal y por nutrientes para fijarse exitosamente en el epitelio,

generando la oportunidad de reconocer cualquier cosa que afecte el equilibrio de la flora intestinal normal, (Bazay, G. 2010).

La flora bacteriana normal del tracto intestinal actúa como una barrera defensiva al impedir que el espacio del epitelio celular quede disponible para los patógenos, ya que crean un ambiente desfavorable para los mismos, dicho de otra forma, si los habitantes del tracto intestinal están seguros en su nicho, el potencial patógeno no podrá actuar ni enfermar al individuo. (Gómez, E. 2010).

Es importante tener en cuenta, que no todos los microorganismos probióticos provocan el mismo tipo de efectos ni con la misma intensidad sobre la respuesta inmune o sobre los microorganismos presentes en la luz intestinal. (Fedorak, R y Madsen, K. 2004), se desconoce cuál es el mecanismo de acción detallado para cada uno de los probióticos. Por este motivo, junto con la variabilidad de las características del huésped al que se administre y de su estado de salud (sanos, con enfermedades infecciosas, inmunoinflamatorias, o neoplásicas), resulta difícil evaluar cuál es el Probiótico más idóneo para cada situación. (Zambrano, A. 2010).

Los mecanismos de acción propuestos para los probióticos son diversos, contienen la normalización de la población microbiana alterada, el mejoramiento de la barrera inmunológica intestinal, especialmente a través de la respuesta de la inmunoglobulina (Ig A) secretora y la rebaja en las respuestas inflamatorias intestinales. (O'Mahony, L. et al, 2005).

3. Criterios de selección para las cepas Probióticas

El criterio utilizado para seleccionar una cepa previa a su producción y a su uso industrial como Probiótico incluye las siguientes valoraciones:

- Capaz de competir con la flora normal.
- Ser idónea para la especie.
- No ser patógeno.
- Resistente a antimicrobianos.

- Potencial de adherencia y colonización.
- Vialidad estabilidad en almacenaje y fabricación.
- Resistencia a la granulación y expansión.
- Resistencia a ácidos estomacales rendimiento y funcionalidad. (Marlli, A. 2013).

La utilización de probióticos en la dieta depende en parte de la cepa utilizada; pues, no todas las cepas tienen la misma capacidad de modulación de la microbiota intestinal. Es por lo anterior, que las bacterias que se pueden utilizar en la alimentación como probióticas se seleccionan con base a una serie de requisitos que deben cumplir y que han de evaluarse de forma individual para cada cepa. Por ello, para seleccionar una cepa como probiótica se debe realizar estudios in vitro apropiados para establecer los posibles beneficios en la salud, (Vélez, J. 2014) entre ellas se encuentran:

a. Resistencia a medios ácidos

Las bacterias probióticas deben sobrevivir a la acidez gástrica que presenta el estómago debido a las secreciones de jugos gástricos como medio de defensa a la mayoría de microorganismos ingeridos. (Jensen, H. et al, 2012).

b. Crecimiento en concentración de 0.3% sales biliares

Deben tener la capacidad de resistir a los efectos de los ácidos biliares que son sintetizados en el hígado, a partir del colesterol y secretados por la vesícula biliar hacia el duodeno. (Klayraung, S y Okonogi, S. 2009).

c. Actividad hemolítica

Producida por la acción de la enzima hemolisina, esta propiedad no es apta cuando se realiza selección de un probiótico, las cepas probióticas no deben tener capacidad de lisar los eritrocitos, para esto es necesario demostrar la presencia de esta capacidad en medios de cultivo con sangre. (Bravo, L. et al, 2009).

d. Actividad antimicrobiana

Las BAL producen varios metabolitos y bacteriocinas con capacidad antimicrobiana, esta prueba verifica la presencia de inhibidores sintetizados por las cepas de estudio (Bravo, L. et al, 2009).

e. Susceptibilidad a los antibióticos

La mayoría de las cepas y especies usadas como probióticas han sido reconocidas como comensales humanos y utilizados de forma segura en la fermentación de alimentos. (Monroy, M. et al, 2009).

B. MICRORGANISMOS DESTINADOS COMO PROBIÓTICOS

Se atribuyen propiedades Probióticas a muchas especies microbianas, siendo comúnmente utilizadas cepas de *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Propionibacterium spp.* y *Enterococcus spp.* (Cross, M. 2002). Se han estudiado aproximadamente 400 especies distintas de microorganismos en el tracto digestivo de monogástricos incluso en el hombre, donde se ha evidenciado que se encuentra colonizado por millones de bacterias perjudiciales y benéficas que no solo se ubican allí, sino también en la boca y en la vagina. (Cross, M. 2002).

A continuación se indican los microorganismos utilizados como probióticos frecuentemente (cuadro 2).

Cuadro 2. MICROORGANISMOS UTILIZADOS COMO PROBIÓTICOS FRECUENTEMENTE.

LACTOBACILLUS	BIFIDOBACTERIUM
<i>Lb. acidophilus</i>	
• <i>Lb. acidophilus</i> LCI	<i>B. bifidum</i>
• <i>Lb. acidophilus</i> NCFB 174B	
<i>Lb. plantarum</i>	<i>B. longum</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>B. infantis</i>
• <i>Lb. casei shirota</i>	
<i>Lb. rhamnosus</i> (estirpe GG)	<i>B. breve</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>B. adolescentes</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	
<i>Lb. fermentum</i>	

Fuente: García, Y. et al. (2005).

También existen otros tipos de microorganismos que son usados como probióticos, (cuadro 3).

Cuadro 3. OTROS MICROORGANISMOS UTILIZADOS COMO PROBIÓTICOS.

OTRAS BACTERIAS	LEVADURAS
<i>Streptococcus salvarius</i> subsp. <i>Thermophiles</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>Enterococcus faecium</i>	
<i>Leuconmostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	
<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>Escherichia coli</i>	

Fuente: García, Y. et al. (2005).

1. Lactobacillus

Lactobacilos, *Lactobacillus* o bacteria del ácido láctico es un género de bacterias Gram positivas anaerobias, denominadas así debido a que la mayoría de sus miembros convierte lactosa y otros monosacáridos en ácido láctico. (González, A. 2010). Los *Lactobacillus* tienen un metabolismo fermentativo, son principalmente aerotolerantes y otras especies son estrictamente anaeróbicas. El crecimiento se da a un pH de 4,5-5,8. Son exigentes en cuanto a aminoácidos, péptidos, nucleótidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos y carbohidratos. (Jurado, H. et al, 2013).

El *Lactobacillus acidophilus* se considera, en términos generales, benéfico, ya que produce vitamina K, lactasa y sustancias antimicrobianas como acidolina, acidolfina, lactocidina y bacteriocina. Varios ensayos realizados en seres humanos reportan beneficios del *L. acidophilus* para la vaginosis bacteriana. Otros usos medicinales del *L. acidophilus* no se han estudiado lo suficiente que permitan llegar a conclusiones firmes. (González, A. 2010).

Varias especies son importantes en la descomposición de material vegetal. La producción de ácido láctico hace que su ambiente sea ácido, lo cual inhibe el crecimiento de bacterias dañinas. Algunas especies de *Lactobacillus* son usadas industrialmente para la producción de yogur y otros alimentos fermentados. (González, A. 2010).

Ciertas bebidas de yogur contienen *Lactobacillus* como suplemento dietético. Muchos *Lactobacillus* son los únicos seres vivos que no requieren hierro para vivir y tienen una tolerancia extremadamente alta al peróxido de hidrógeno. (González, A. 2010).

Numerosos *Lactobacillus* son inusuales, operan usando un metabolismo homofermentativo (es decir, sólo producen ácido láctico a partir de azúcares) y son aerotolerantes a pesar de la ausencia de cadena respiratoria. Esta aerotolerancia es dependiente del manganeso y ha sido estudiada y explicada en *Lactobacillus plantarum*. (González, A. 2010).

Tiene 40 especies diferentes. La mayoría están en la cavidad oral. Son bacilos, Gram +, pleomorfas (pueden adoptar diferentes formas), aparecen en parejas y a veces se asocian como empalizadas. (González, A. 2010).

Crece en condiciones de anaerobiosis (aunque el oxígeno no es tóxico para ellos). Se desarrollan bien en concentraciones de Dióxido de Carbono del 1 al 20%. Los componentes carecen de actividad proteolítica (no pueden degradar proteínas), fermenta azúcares, los cuales utiliza como fuente de energía, por lo cual se usan en industria alimentaria: yogures, quesos (fermentación láctica de la leche).

a. *Lactobacillus* presentes en animales

El interés por las terapias preventivas y suplementos nutricionales ha aumentado en los últimos años. Los probióticos que son organismos vivos que al ser ingeridos afectan de manera benéfica al huésped que los consumió, mejorando su balance intestinal. (Claesson, M. et al, 2012).

Existen diversos estudios donde se comprueba este efecto benéfico de los probióticos en la salud animal. Entre ellos, estudios realizados por (Casey, P. et al, 2007), que aislaron BAL del tracto gastrointestinal de origen porcino observando una inhibición significativa del crecimiento de *Salmonella*, (Tellez, G. et al, 2012), encontró los mismos resultados en aves de corral. En experimentos realizados con lechones de 4-5 semanas de edad indican que la administración de un aditivo oral con cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Enterococcus faecium* adicionadas al pienso redujeron significativamente ($P < 0,01$) la concentración de bacterias del grupo coliformes en íleon y ciego, y aumentaron la concentración de *Lactobacillus* en todo el tracto intestinal, evitando las diarreas y constituyendo una alternativa válida para sustituir a los antibióticos prohibidos como promotores del crecimiento, al mejorar la relación *Lactobacilos* / *E.coli*. (Riopérez, J. 2005).

2. Las Bifidobacterias

Que de modo aún más eficaz que las anteriores producen diversas vitaminas del complejo B siendo unas magníficas protectoras del intestino grueso. Las *Lactobacillus bulgaricum* que suelen ser bacterias viajeras transitorias que ayudan a las anteriores durante su tránsito por el sistema gastrointestinal. (García, M. et al, 2012).

C. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

El aislamiento de un microorganismo a partir de una muestra implica que este sea viable ("vivo"). Sin embargo, la interpretación de las pruebas de aislamiento microbiano debe ser interpretada con cautela. (Valladares, 2010). El aislamiento de un microorganismo no implica necesariamente su papel como patógeno en un proceso de enfermedad, puede eventualmente tratarse de flora saprofita o un agente vacunal. (Valladares, J. 2010). El microorganismo aislado puede requerir de una tipificación posterior, como una tipificación antigénica, la demostración de factores de virulencia, etc. Así mismo, la falta de aislamiento del microorganismo no implica necesariamente que éste no sea la causa de la enfermedad. En bacteriología se usan medios enriquecidos y selectivos artificiales, pruebas bioquímicas y en algunos casos identificación por medio de antiseros. Los resultados se expresan como género y especie bacteriana aislada y en ocasiones su cantidad relativa (crecimiento abundante, moderado o escaso). (Valladares, J. 2010).

D. PRUEBAS DE MICROBIOLOGÍA

Estas pruebas detectan bacterias, hongos o virus, ya sea por medio de su aislamiento, identificación y tipificación o bien por la demostración de sus antígenos; usualmente se realizan a partir de tejidos de aves seleccionadas específicamente para tal fin, pero también se pueden hacer estudios a partir de alimento, agua, ingredientes, cama, instalaciones, equipo, etc. (Valladares, J. 2010). Los métodos más utilizados para la conservación son la refrigeración y la congelación, particularmente en aquellas muestras que por su naturaleza posean

una flora bacteriana normal, ya que el sobre crecimiento de dicha flora puede inhibir el crecimiento de los agentes patógenos. (Valladares, J. 2010).

1. Pruebas de identificación

a. Morfología de las colonias bacterianas

Una colonia es una agrupación de bacterias formada a partir de la reproducción de una Unidad Formadora de Colonia (UFC), sobre un medio sólido; aunque varía de tamaño generalmente es visible a simple vista. Una UFC puede ser un solo microorganismo o bien un grupo de microorganismos de una misma especie como en el caso de bacterias que tienen tendencia a permanecer unidas como los estafilococos o los estreptococos. (Negróni, C. 2009).

Las colonias bacterianas tienen una medida, forma, textura y en algunos casos color característicos, que aunque puede variar de acuerdo al medio en que se encuentren, es constante bajo condiciones controladas y depende de la especie bacteriana que la forme. (Negróni, C. 2009).

La morfología colonial es comparable a una estadística ya que se deriva de una célula individual pero es la característica de la masa celular. Así pues, por ejemplo, la pigmentación es aparente en la colonia, pero no en la célula individual, en el caso de la consistencia mucosa de algunas colonias esta se deriva de la sustancia capsular en aquellas bacterias con cápsula muy grande.

(1) Medida de las colonias

Esta característica es bastante constante dentro de las especies y puede ir desde colonias muy diminutas hasta un diámetro de varios milímetros. (Negróni, C. 2009).

(2) Forma

Está determinada por su borde y su espesor, varias formas, elevaciones y bordes de colonias bacterianas. (Negroni, C. 2009).

(3) Consistencia y textura

La consistencia de las colonias puede variar desde una colonia seca que puede moverse sobre el agar con el asa, hasta una colonia viscosa que se pega al asa y forma filamentos o hilos mucosos cuando se trata de separarla del agar. (Negroni, C. 2009).

(4) La superficie

Puede ser uniformemente brillante y suave o puede ser estriada con muescas concéntricas o quebradas. Al examinar la colonia con luz transmitida puede aparecer con textura granular o amorfa. (Negroni, 2009).

(5) Pigmentación

Esta característica es muy común en las bacterias saprófitas en las que las colonias aparecen rojas, anaranjadas, amarillas, etc. De los microorganismos patógenos uno de los pigmentados más importantes es *Staphylococcus aureus* que tiene un color amarillo dorado. El pigmento no se aprecia en las células individuales a que se debe a gránulos intracelulares muy pequeños para verse con luz transmitida. (Negroni, C. 2009).

b. Tipificación bacteriana

La tipificación de las bacterias se basa en el estudio de sus características mediante técnicas que oscilan entre las más sencillas tinciones y los más complejos estudios moleculares. Una técnica útil y de bajo costo consiste en la tinción de Gram y posterior observación de la muestra mediante el microscopio de luz para estudiar las bacterias, su forma, tipo de agrupación y color:

Grampositivas o Gramnegativas. La mayor parte de las bacterias puede ser ubicada en uno de estos dos grupos o en un tercero, de acuerdo a la ácido-alcohol resistencia que presenten.

c. Tinción Gram

La pared celular de los lactobacilos, observada al microscopio electrónico es típicamente Gram positiva y contiene peptidoglicanos (mureínas) de varios quimiotipos, de ahí que el peptidoglicano del tipo Lisina-D-Asparagina es el más ampliamente distribuido. Esta pared también contiene polisacáridos unidos al peptidoglicano mediante enlaces fosfodiéster, pero sólo presenta ácidos teicoicos relacionados a ella en algunas especies, (Kandler, O y Weiss, N. 1992).

Cuando estas bacterias son teñidas con el Gram y quedan de color rojo, se les denomina Gram negativos. Las bacterias que carecen de pared celular tienen gran plasticidad (micoplasmas) y adoptan una variedad de formas. Las bacterias esféricas tienen un tamaño promedio de 1 micrómetro de diámetro, mientras que los bacilos miden 1.5 micrones de ancho por 6 micrómetros de largo. (Molina, J y Uribarren, T. 2011).

d. Movilidad

Las bacterias generalmente poseen una pared celular y uno o varios flagelos que utilizan para desplazarse por el entorno, esta capacidad de movilidad les otorga un gran beneficio ya que pueden moverse hacia zonas más favorables para su crecimiento, donde las condiciones o la disponibilidad de alimento son mejores. (Pino, F. 2012).

El agar es el agente solidificante y a esta concentración le otorga al medio la propiedad de ser semisólido, condición necesaria para detectar movilidad, que se evidencia por el enturbiamiento del medio o por crecimiento que difunde más allá de la línea de siembra del microorganismo en estudio. (Pino, F. 2012).

2. Repuesta Bioquímica

a. Prueba de la catalasa

La enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno bajo la fórmula $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$. De esta manera las bacterias se protegen del efecto tóxico del H_2O_2 , que es un producto final del metabolismo aerobio de los azúcares, (Seija, V. 2002). El desprendimiento de burbujas se considera una prueba positiva. (Seija, V. 2002).

b. Producción de gas

Los microorganismos capaces de formar gas producen la aparición de burbujas y/o la ruptura del medio de cultivo. Ej: *Escherichia*. (Montoya, A. 2010).

c. Producción de sulfuro de hidrogeno

Los microorganismos capaces de formar H_2S se manifiestan por la aparición de un color negro en fondo del tubo debido a la formación de sulfuro ferroso. Ej: *Salmonella*, *Proteus*, *Citrobacter*. (Montoya, A. 2010).

3. Análisis de Virulencia

a. Actividad Hemolítica

Esta actividad constituye un método para la detección de microorganismos potencialmente productores de tensioactivos, ya que dichos compuestos presentan la propiedad de lisar los glóbulos rojos. De éste modo se logra una rápida detección de cepas con actividad superficial (24 h), en comparación con los tamizajes basados en vías fermentativas, que requieren de largos períodos de incubación. (Morales, M. et al, 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal, de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo situada en la Panamericana Sur Kilómetro 1½, Parroquia Lizarzaburu, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo.

El trabajo experimental tuvo una duración de 120 días.

1. Condiciones Meteorológicas

Las condiciones Meteorológicas imperantes en laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal son las siguientes, (cuadro 4).

Cuadro 4. CONDICIONES METEOROLÓGICAS DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA ANIMAL.

Parámetros	Valores
Temperatura promedio, °C	13.40
Humedad relativa, %	63.10
Precipitación, mm/año	564.50
Velocidad del viento, m/s	2.1

Fuente: Negrete, J y Aréballo, M. (2014).

B. UNIDADES EXPERIMENTALES

Esta investigación estaba constituida de 36 muestras (unidades experimentales) recopiladas de aves en tres estados fisiológicos y dos regiones intestinales (colon y ciego) con tres repeticiones en dos ensayos consecutivos.

C. MATERIALES, EQUIPOS, E INSTALACIONES

Los materiales, equipos e instalaciones que se utilizaron en la presente investigación fueron los siguientes:

1. Materiales

- Frascos de vidrio
- Cubas anaeróbicas
- Vasos de precipitación
- Matraz Erlenmeyer
- Pipetas
- Mechero
- Peras de tres vías
- Gradilla
- Cajas Petri
- Tubos de ensayo
- Campanas Durham
- Portaobjetos
- Frascos de 250 ml
- Puntas para micropipeteador
- Asas de cultivo
- Equipo de disección
- Cuchara desechable
- Cepillo para tubo
- Mandil
- Libreta
- Esferos

2. Reactivos y medios de cultivo

- Agar MRS
- Agar Sangre

- Caldo MRS
- Medio SIM (Movilidad Indol Ácido Sulfhídrico)
- Peróxido de Hidrogeno
- Glucosa
- Leche estéril

3. **Equipos**

- Autoclave
- Microscopio
- Cabina de flujo laminar
- Estufa
- Agitador
- Balanza Electrónica
- Computadora
- Pen Drive
- Cámara fotográfica

4. **Instalaciones**

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal (LABIMA), de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

D. TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

En la presente investigación se utilizaron aves en tres estados fisiológicos (de 0 – 21 días, de 22 – 35 días y de 36 – 49 días) y dos regiones intestinales (colon y ciego) con tres repeticiones en dos ensayos consecutivos, cuyos resultados experimentales se analizaron mediante estadística descriptiva y la prueba del Chi cuadrado, debido a que no se aplica tratamientos.

E. MEDICIONES EXPERIMENTALES

Los indicadores que se evaluaron en la presente investigación fueron:

1. Respuesta Morfológica

- Morfología de la colonia (Regular cremosa, Convexa, Regular puntiforme, Regular seca).
- Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml).
- Morfología de las bacterias y Características tintoriales (Coco, Bacilo, Vibrio, Espiroqueta, Espirilo) Gram (+/-).
- Movilidad (+/-).

2. Repuesta Bioquímica

- Prueba de la catalasa (+/-).
- Producción de gas (+/-).
- Producción de Ácido (+/-).
- Producción de sulfuro de hidrogeno (+/-).

3. Análisis de Virulencia

- Actividad Hemolítica (+/-).
- Capacidad de coagulación de la leche (+/-).

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA

Para las variables discretas se utilizaron estadística descriptiva y para las variables cualitativas el Chi cuadrado.

Las unidades experimentales fueron determinados bajo el modelo de Chi cuadrado y para su análisis se ajustaron al siguiente modelo.

$$X^2 = \frac{\sum (O - E)^2}{E}$$

Dónde:

X^2 = Chi cuadrado

Σ = Sumatoria

O = Observado

E = Esperado

G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Obtención de muestras

a. Faena de los pollos

Los pollos de los diferentes estados fisiológicos fueron faenados por el método de degüello.

b. Recolección de las muestras

Una vez faenado los pollos, se procedió a la disección y la obtención de las regiones que fueron motivos de estudio, el ciego y el colon de los diferentes estados fisiológicos y trasladados al laboratorio.

2. Procedimiento microbiológico

a. Preparación del caldo MRS y enriquecimiento de las muestras

Se preparó 3600 ml de caldo MRS por litro de Agua destilada, considerando que son 36 muestras, 100 ml para cada muestra. Una vez preparado fueron esterilizados.

Las muestras colectadas fueron enriquecidas con el caldo MRS e incubado a 38 °C por 24 horas.

b. Aislamiento de *Lactobacillus* spp.

Se realizaron diluciones decimales de las muestras hasta 10^{-5} en agua peptonada estéril, se sembraron alícuotas de 1 ml en cajas Petri con agar MRS se incubó por 72 horas en atmósfera de microaerofilia por método de la vela.

c. Selección e identificación preliminar de *Lactobacillus* spp.

Se realizó teniendo como base las características morfológicas de las colonias como el color, textura, forma, formación de los bordes y elevación, morfologías individuales y tintoriales de las bacterias, para ello se sembró los cultivos puros en agar MRS. Luego, de cada cultivo puro se realizaron las siguientes evaluaciones.

(1) Evaluación Morfológica

Luego, de cada cultivo puro se realizaron las tinciones Gram, precisando si son Gram positivas o Gram negativas.

(2) Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml)

Se realizó el conteo de las colonias multiplicando por el factor de dilución.

(3) Movilidad

Los cultivos puros fueron sembrados en el medio Movilidad Indol Ácido Sulhídrico (SIM), luego se incubaron a 37°C por 24 horas y las lecturas se observaron por presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra.

d. Evaluación Bioquímica

(1) Prueba de la catalasa

Con una pipeta Pasteur agregamos una gota de Peróxido de Hidrógeno sobre un portaobjetos, luego suspenderemos el cultivo puro, las muestras observadas con la presencia de burbujas se registraron como positivo.

(2) Producción de gas y ácido

Los cultivos puros fueron sembrados en caldo MRS (10 ml por tubo) con glucosa al 1 %, y el indicador púrpura de bromocresol y campanas Durham, luego se incubaron a 37°C por 24 – 48 horas, se considerarán positivo al cambio de color purpura a amarillo y la presencia de gas en la campana de Durham como una reacción positiva.

(3) Producción de sulfuro de hidrogeno

Los cultivos puros fueron sembrados en medio Movilidad Indol Ácido Sulfhídrico (SIM), luego se incubaron a 37°C por 24 horas y las lecturas se observaron por ennegrecimiento del medio de cultivo a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio como resultado positivo.

e. Análisis de Virulencia

(1) Actividad Hemolítica

Los cultivos puros fueron sembrados en agar Sangre, luego se incubaron a 37°C por 48 horas en condiciones microaerobiosis, luego se realizó la lectura observando la presencia de hemólisis como una respuesta positiva.

(2) Capacidad de coagulación de la leche

Los cultivos puros fueron sembrados en leche estéril, luego se incubaron a 37°C, la lectura se realizó observándose la formación de un coágulo uniforme a partir de las 4 horas como una respuesta positiva.

H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

1. Respuesta Morfológica

- Morfología de la colonia (Regular cremosa, Convexa, Regular puntiforme, Regular seca).
- Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml).
- Morfología de las bacterias y Características tintoriales (Coco, Bacilo, Vibrio, Espiroqueta, Espirilo) Gram (+/-).
- Movilidad (+/-).

2. Repuesta Bioquímica

- Prueba de la catalasa (+/-).
- Producción de gas (+/-).
- Producción de Ácido (+/-).
- Producción de sulfuro de hidrogeno (+/-).

3. Análisis de Virulencia

- Actividad Hemolítica (+/-).
- Capacidad de coagulación de la leche (+/-).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA MORFOLÓGICA DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

1. Morfología de la colonia

Existió la presencia de microorganismos probióticos en los diferentes estados fisiológicos (inicial, crecimiento, engorde), así como en el ciego y colon de los pollos, se determinó que las colonias tienen forma regular cremosa y convexa, coincidiendo con la descripción del género *Lactobacillus* mencionado por (Kandler, O y Weiss, N. 1992).

2. Morfología individual

La morfología individual de los *Lactobacillus* como microorganismos probióticos presentaron forma de bacilo y cocos en los diferentes estados fisiológicos de las aves y en cada una de las zonas del tracto digestivos (ciego y colón). La morfología individual dentro del mismo género varía ya que puede presentarse formas largas, cortas, rectas, ligeramente curvadas dependiendo de las especies y subespecies. (Kandler, O y Weiss, N. 1992).

3. Unidades formadoras de colonia UFC/ml

Al evaluar las regiones (ciego y colon) de los pollos sacrificados, se determina que por cuanto $F_{cal} = 0.62 > F_{tab} = 0.43$, las UFC/ml de *Lactobacillus* presentan diferencias significativas (cuadro 5), de acuerdo al coeficiente de variación los datos se dispersan de la media en un 32.96%.

Al determinar la presencia de UFC/ml de *Lactobacillus*, en los diferentes estados fisiológicos de los pollos presentan diferencias significativas por cuanto $F_{cal} = 3.96 > F_{tab} = 0.03$, la variabilidad de los obtenidos es alta determinándose que puede haber error en los resultados.

Al realizar la interacción entre los tres estados fisiológicos (inicial, crecimiento y engorde) y las dos regiones (ciego y colon), de los pollos, no presento diferencias significativas, la dispersión de los datos de la medias es de 32.96%, considerada una variación elevada.

Cuadro 5. RESUMEN DEL ADEVA.

F. V	GL	SC	CM	F. Cal	F. tab.
Total	53,00	30,89			
Regiones	1	0,34	0,34	0,62	0,43
Estadío Fisiológico	2	4,32	2,16	3,96	0,03
Int. AB	2	0,03	0,01	0,02	0,98
Error	48,00	26,20	0,55		
CV %			32,96		
Media			2,24		

F. cal: Fisher calculado.

F. tab: Fisher tabular.

De acuerdo a la aplicación de la prueba de Tukey (cuadro 6), se identifica que en la etapa inicial de los pollos existe mayor producción de bacterias ácido lácticas con 2.61×10^8 UFC/ml, la misma que no difiere significativamente con la cantidad de UFC/ml producidas en la etapa de engorde de los pollos, a su vez se determina que en la etapa de crecimiento de pollos existe baja producción de microorganismos probióticos con 1.92×10^8 UFC/ml, valor que difiere significativamente ($P < 0.05$) con las anteriores, finalmente se determina que las etapas de los pollos en las que se logra una excelente producción de probióticos es la etapa inicial y crecimiento.

Cuadro 6. SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY AL 5 %.

Estadío fisiológico	Media	Rango
Inicial	2,61	a
Crecimiento	2,19	b
Engorde	1,92	ab

4. Características tintoriales

Según el método de la tinción Gram realizado a los cultivos de microorganismos aislados de los pollos en la fase de inicial, crecimiento y engorde en el ciego y colon presentaron casos positivos en 12, 10, 10, 11, 12 y 12, valores que difieren significativamente ($P < 0.01$), de los casos negativos que se presentaron en una cantidad pequeña, en el colon en la fase inicial (dos casos), en la fase de crecimiento en el ciego y colon se presentaron dos y un caso respectivamente (cuadro 7), debido a que la estructura de la pared celular que posee las bacterias del género *Lactobacillus* tienen una gruesa capa de peptidoglicano, se pudo observar una tinción Gram + en los dos tractos digestivos analizados de los diferentes estados fisiológicos. En los casos negativos se puede decir que existió error en la tinción o se presentaron células muertas pudiendo dar resultados variables en este método de caracterización. (Samaniego, L y Sosa del Castillo, M. 2002).

Al realizar la tinción Gram a las muestras de *Lactobacillus* extraídos del ciego y colon en los estados fisiológicos inicial, crecimiento y engorde se obtuvieron un total de 67 casos positivos mismos que difieren de los 5 casos negativos.

Cuadro 7. RESPUESTA BIOQUÍMICA Y DE VIRULENCIA DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EN EL CIEGO Y COLON DE POLLOS EN INTERACCIÓN CON LA FASE INICIAL, CRECIMIENTO Y ENGORDE.

Variables	N	Inicial				Crecimiento				Engorde				X ² cal	Sign.
		Ciego		Colon		Ciego		Colon		Ciego		Colon			
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-		
Morfología colonia		Regular		Regular		Regular		Regular		Regular		Regular			
Forma individual		Bacilo		Bacilo		Bacilo		Bacilo		Bacilo		Bacilo			
Tinción Gram	12	12	0	10	2	10	2	11	1	12	0	12	0	55,00	**
Catalasa	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	72,00	**
Acidez	12	11	1	12	0	12	0	11	1	10	2	10	2	51,33	**
Gas	12	2	10	3	9	2	10	4	8	7	5	7	5	15,67	Ns
H ₂ S	12	1	11	1	11	0	12	3	9	0	12	1	11	52,00	**
Movilidad	12	0	12	1	11	3	9	0	12	0	12	1	11	55,67	**
Act. Hemolítica	12	6	6	2	10	5	5	3	9	4	8	4	8	11,33	Ns
Cap. Coag. leche	12	12	0	12	0	7	3	11	1	12	0	10	2	51,33	**

GL 9
 χ^2 0,05 16,9
 χ^2 0,01 21,07
X² cal: Chi cuadrado calculado.
Sign: Significancia.
GL: Grados de libertad.
Ns: No significativo.
**: Altamente significativo.

B. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA BIOQUÍMICA DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

1. Prueba de catalasa

Al realizar la prueba de catalasa en los sustratos obtenidos del ciego y colon de los pollos sacrificados en la fase inicial, crecimiento y engorde, no se registró ni un caso positivo a esta prueba, por lo que se presentan diferencias altamente significativas ($P < 0.01$), estos resultados se obtuvieron debido a que los *Lactobacillus* no poseen la enzima catalasa que descompone el peróxido de hidrogeno, (Naidu, A. et al. 1999). Con estos resultados se puede determinar que las cepas de *Lactobacillus* pueden ser extraídos de las dos zonas del tracto digestivo (ciego y colon) y en las diferentes etapas fisiológicas, inicial, crecimiento y engorde, ya que no registran diferencias significativas, por lo tanto se determina que la calidad de las cepas de estos microorganismos son similares.

2. Prueba de acidez

En lo referente a la prueba de acidez que se realizó a las muestras extraídas del ciego y colon de los pollos sacrificados en la fase inicial, crecimiento y engorde se registraron casos positivos en 11, 12, 12, 11, 10, 10 valores que presentan diferencias altamente significativas ($P < 0,01$), con los casos negativos que se registraron en cantidades pequeñas, en las fase inicial en la zona del ciego se registró un caso, en la etapa de crecimiento también se presentó un caso pero en la zona del colon, mientras que en el último estado fisiológico (engorde) se registró dos casos negativos en cada una de las zonas evaluadas, esto se debe a que la mayoría de los *Lactobacillus* presentes en el tracto digestivo son capaces de fermentar azúcares, principalmente la lactosa transformándolo en ácidos orgánicos como el ácido láctico por homofermentación y el ácido acético, (Kandler, O. 1983).

Al analizar el cuadro 8, respecto a la prueba de acidez de los *Lactobacillus*, extraídos del ciego y colon en los tres estados fisiológicos (inicial, crecimiento y engorde), se obtuvieron un total de 66 casos positivos, mismos que presentan diferencias altamente significativas con los 6 casos negativos registrados.

Al realizar el análisis de los microorganismos probióticos que fueron extraídos de las zonas del colon y ciego, en las etapas inicial, crecimiento y engorde de los pollos, no se registraron diferencias significativas por lo que se puede determinar que el aislamiento de estos microorganismos, se puede realizar de cualquiera de las zonas y a cualquier etapa fisiológica que se mencionó anteriormente ya que presentan características similares.

Cuadro 8. RESPUESTA BIOQUÍMICA Y DE VIRULENCIA DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EN EL CIEGO Y COLON DE POLLOS SACRIFICADOS EN LA FASE INICIAL, CRECIMIENTO Y ENGORDE.

Variables	N	Fase de desarrollo						x ² cal	Sign.
		Inicial		Crecimiento		Engorde			
		+	-	+	-	+	-		
Tinción gram (+)	24	22	2	21	3	24	0	54,17	**
Catalasa (-)	24	0	24	0	24	0	24	72,00	**
Acidez (+)	24	23	1	23	1	20	4	51,00	**
Gas (-)	24	5	19	6	18	14	10	14,83	*
H ₂ S (-)	24	2	22	3	21	1	23	50,33	**
Movilidad (-)	24	1	23	3	21	1	23	53,83	**
Act. Hemolítica (-)	24	8	16	8	16	8	16	8,00	Ns
Cap. Coag. leche (+)	24	23	1	18	6	22	2	42,83	**
GL	5								
x ² 0,05	11,1								
x ² 0,01	15,1								

X² cal: Chi cuadrado calculado.

Sign: Significancia.

GL: Grados de libertad.

Ns: No significativo.

** : Altamente significativo.

* : Significativo.

3. Producción de gas

El cuadro 9, nos muestra que al analizar las 72 cepas extraídas de los pollos en los estados fisiológicos inicial, crecimiento y engorde, de los tractos digestivos ciego y colon se obtuvo 47 respuestas favorables de acuerdo a los criterios de la investigación, mismas que no presentan significancia con los valores positivos 11 que se encontraron en el ciego y 14 encontradas en el colon, la razón por la que las 25 muestras dieron positivo a esta prueba puede ser que las mismas se encontraban contaminadas por agentes patógenos entéricos, que pueden presentarse en el animal por una mala alimentación, stress, entre otras causas.

Respecto a este análisis se puede apreciar un $X^2_{Cal} = 3,43$ frente a un X^2 ($P < 0.05$) = 11,1 lo que indica que no existe diferencias significativas entre los valores, siendo resultados favorables para la investigación porque se dio cumplimiento al objetivo planteado, ya que los microorganismos probióticos pueden ser extraídos a cualquier edad (inicial, crecimiento y engorde) y de cualquiera de las dos zonas (ciego y colon) del tracto digestivo de los pollos, ya que presentan características bioquímicas, morfológicas y de virulencia similares.

Cuadro 9. RESPUESTA BIOQUÍMICA Y DE VIRULENCIA DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EN EL CIEGO Y COLON DE POLLOS SACRIFICADOS EN LA FASE INICIAL, CRECIMIENTO Y ENGORDE.

Variables	N	Tracto Digestivo				x ² cal	Sign.
		Ciego		Colon			
		+	-	+	-		
Tinción gram (+)	72	34	2	33	3	53,44	**
Catalasa (-)	72	0	36	0	36	72,00	**
Acidez (+)	72	33	3	33	3	50,00	**
Gas (-)	72	11	25	14	22	7,22	Ns
H ₂ S (-)	72	1	35	5	31	50,89	**
Movilidad (-)	72	3	33	2	34	53,44	**
Act. Hemolítica (-)	72	15	21	9	27	10,00	*
Cap. Coag. leche (+)	72	31	5	32	4	40,56	**
GL	5						
x ² 0,05	11,1						
x ² 0,01	15,1						

X² cal: Chi cuadrado calculado.

Sign: Significancia.

GL: Grados de libertad.

Ns: No significativo.

** : Altamente significativo.

* : Significativo.

4. Producción de H₂S

Las cepas de *Lactobacillus* extraídas del tracto digestivo de los pollos sacrificados en los diferentes estados fisiológicos (inicial, crecimiento y engorde), presentaron valores negativos altos 11, 11 12, 9, 12 y 11 mismos que difieren significativamente ($P < 0.01$), de los valores positivos registrados en cantidades menores 1, 1, 3, 1.

Se puede mencionar que de las 72 cepas de *Lactobacillus* extraídas en las diferentes etapas fisiológicas de los pollos, la zona del tracto digestivo que presentó mayor número de cepas favorables para la investigación fue el ciego con un valor de 35 y el colon con 31, valores que difieren significativamente de los casos que resultaron positivos a esta prueba 1 y 5 en el colon y ciego respectivamente.

De acuerdo a los datos que se obtuvieron (cuadro 10), al evaluar las características bioquímicas, morfológicas y de virulencia de los microorganismos probióticos extraídos en la fase inicial, crecimiento y desarrollo, de las zonas del ciego y colon de los pollos, no registraron diferencias significativas entre los datos. Por lo tanto se determina que los microorganismos probióticos (*Lactobacillus*), en los pollos pueden obtenerse a cualquier etapa fisiológica y de cualquiera de las zonas del tracto digestivo, antes mencionadas, ya que las características evaluadas en la investigación son similares.

Cuadro 10. ANÁLISIS DE LAS RESPUESTAS BIOQUÍMICAS Y DE VIRULENCIA DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EXTRAÍDOS DEL CIEGO Y COLON DE POLLOS SACRIFICADOS EN LAS FASES INICIAL, CRECIMIENTO Y ENGORDE.

Variables	N	Inicial				Crecimiento				Engorde				x ² cal	Sign.
		Ciego		Colon		Ciego		Colon		Ciego		Colon			
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-		
Tinción Gram	69	12		10		10		11		12		12		0,33	ns
Catalasa	69		12		12		12		12		12		12	0,00	ns
Acidez	69	11		12		12		11		10		10		0,27	ns
Gas	69		10		9		10		8		5		5	3,43	ns
H ₂ S	69		11		11		12		9		12		11	0,55	ns
Movilidad	69		12		11		9		12		12		11	0,61	ns
Act. Hemolítica	69		6		10		5		9		8		8	2,26	ns
Cap. Coag. leche	69	12		12		7		11		12		10		0,64	ns

GL

5

x² 0,05

11,1

x² 0,01

15,1

X² cal: Chi cuadrado calculado.

Sign: Significancia.

ns: No significativo.

5. Movilidad

Al realizar esta prueba bioquímica a las cepas de los *Lactobacillus*, presentes en las dos zonas del tracto digestivo de los pollos sacrificados en las etapas inicial, crecimiento y engorde, se registró casos negativos en 23, 21 y 23 respectivamente, datos que difieren significativamente de los 5 casos positivos registrados.

Respecto a esta propiedad se puede determinar que de las 72 muestras analizadas en las etapas inicial, crecimiento y engorde, de 36 las muestras tomadas del ciego, 33 no presentaron movilidad, mientras que en el colon 34 muestras de las 36 analizadas no presentaron movilidad, mismas que presentan diferencias significativas con las respuestas positivas registradas en menor cantidad 3 en el ciego y 2 muestras en el colon, los 67 casos negativos son resultados favorables para la investigación, ya que el género *Lactobacillus* no tienen ni flagelos ni ninguna otra estructura para ayudar a su movimiento. (González, A. 2010).

Al realizar el análisis de movilidad a los *Lactobacillus*, aislados del ciego y colon de los pollos, en los estados fisiológicos inicial, crecimiento y engorde, se registró un $X^2_{cal}=0.61$, frente a un $X^2(P<0.01)= 15.1$, es decir, que no presentan diferencias estadísticas significativas, entonces podemos aislar estos microorganismos en los pollos tanto en la etapa inicial, crecimiento y engorde, así como también en las dos zonas del tracto digestivo ciego y colon, ya que existe una alta similitud en las características.

C. ANÁLISIS DE VIRULENCIA DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

1. Actividad hemolítica

Al realizar el análisis de la actividad hemolítica de los *Lactobacillus* obtenidos de los pollos en la fase inicial, crecimiento y engorde de los tractos digestivos (ciego y colon), no presentó diferencias significativas entre los datos, pero si se puede

apreciar diferencias numéricas ya que presenta un $X^2_{cal} = 11.33$ frente a un $X^2_{0.05} = 16.9$.

Al evaluar la actividad hemolítica de las 72 cepas de *Lactobacillus* que fueron extraídos del ciego y colon en los tres estados fisiológicos (inicial, crecimiento y engorde) de los pollos, se pudo determinar que los datos difieren significativamente, esto se debe a que de las 36 muestras extraídas del ciego 21 son negativas a la actividad hemolítica mismas que difieren de las 15 muestras positivas, en cambio de las 36 cepas extraídas del colon, 27 son negativas a este análisis y 9 muestras fueron positivas, existiendo significancia entre los valores. Los resultados positivos pueden deberse a la posible patogenicidad de las cepas ya que demuestra la presencia de antígenos somáticos y/o flagelares capaces de destruir los eritrocitos. En consecuencia los microorganismos del género *Lactobacillus* no deben presentar capacidad hemolítica (Pineda de Mora, Y. 1999).

Con esta investigación se determino, que las características de los microorganismos probióticos (*Lactobacillus*), que fueron aislados de las zonas del ciego y colon en los estados fisiológicos inicial, crecimiento y engorde de los pollos son similares, es decir no se registraron diferencias estadísticas, siendo esto favorable ya que se cumple satisfactoriamente los objetivos planteados al iniciar la investigación.

2. Capacidad de coagulación de la leche

En lo referente a este análisis se pudo determinar que los datos obtenidos presentan diferencias altamente significativas, debiéndose a que las 12 cepas evaluadas en la etapa inicial tanto del ciego y colon dieron una respuesta positiva a esta prueba, mientras que en la etapa de crecimiento de las 12 muestras evaluadas en cada zona del tracto digestivo se obtuvieron 18 muestras favorables mismas que difieren significativamente de los 4 casos negativos registrados y finalmente en la etapa de engorde, al analizar las 24 cepas obtenidas de las dos zonas del tracto digestivo, se obtuvieron únicamente 2 muestras en el colon que

no respondieron a esta prueba. La capacidad de coagulación de la leche es una actividad propia de estos microorganismos.

Las dos zonas del tracto digestivo que fueron evaluadas presentaron casi el mismo número de muestras que dieron positivo a este análisis con valores de 31 y 32 en el ciego y colon respectivamente, estos valores registran diferencias altamente significativas ($P < 0.01$), con los valores negativos que se registraron en cantidades pequeñas en las dos zonas del tracto intestinal de los pollos (ciego y colon), en 5 y 4 respectivamente.

El aislamiento de los microorganismos probióticos en los pollos se puede realizar a cualquier edad del animal (inicial, crecimiento y engorde), y de cualquiera de las dos zonas evaluadas (ciego y colon), ya que las características de los *Lactobacillus*, no difieren significativamente, aunque se aprecian diferencias numéricas.

V. CONCLUSIONES

1. Al realizar esta investigación en los *Gallus gallus*, se logró aislar microorganismos probióticos del genero *Lactobacillus*, en las dos zonas del tracto intestinal (ciego y colon), y en los tres estados fisiológicos inicial, crecimiento y engorde, esto es muy importante ya que los microorganismos probióticos aislados pueden ser utilizados en el mismo animal, sustituyendo a las cepas tradicionales.
2. Logró determinar que las dos zonas del tracto digestivo de *Gallus gallus*, son ideales para la producción de microorganismos probióticos, ya que se lograron aislar 2.32×10^8 UFC/ml en el ciego y 2.16×10^8 UFC/ml en el colon.
3. Con esta investigación se determinó que todos los estados fisiológicos de *Gallus gallus*, son propicios para el aislamiento de microorganismos con carácter probiótico, ya que en los resultados no existe una diferencia significativa entre los tres estados fisiológicos.
4. Los microorganismos probióticos, *Lactobacillus* que se aislaron de las dos zonas del tracto intestinal de los pollos en los tres estados fisiológicos (inicial, crecimiento y engorde), se lograron caracterizar morfológica y bioquímicamente, debido a que estos microorganismos poseen características particulares que otros microorganismos no poseen.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar pruebas de biología molecular que ayuden en la identificación de sub-especies de *Lactobacillus* que se encuentran en el tracto digestivo de los pollos en los diferentes estados fisiológicos.
2. Evaluar el comportamiento productivo de los pollos utilizando las cepas de *Lactobacillus* que se lograron aislar en las diferentes etapas fisiológicas y en las dos zonas del tracto intestinal de estas aves.
3. Realizar este tipo de investigación en otras especies animales para determinar la existencia de microorganismos probióticos que puedan ser usadas en las mismas especies.

VII. LITERATURA CITADA

1. Barreda, P. (2009). PROBIÓTICOS. Conciencia Animal.
2. Bazay, G. (2010). Uso de los probióticos en la alimentación animal con énfasis en *Saccharomyces*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Medicina Veterinaria, 20.
3. Bravo, L., Correa, Y., Clausell, J., Fernández, A., Ramírez, M., Núñez, F., y otros. (2009). Caracterización de factores de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de pacientes con diarrea aguda en Cuba. *Revista Chilena de Infectología* , 26(3):233-238.
4. Cabrera, O. (2014). El uso de los acidificantes en avicultura. <http://agrinews.es/2014/03/18/el-uso-de-los-acidificantes-en-avicultura/#prettyPhoto>.
5. Casey, P., Gardiner, G., Casey, G., Bradshaw, B., Lawlor, P., Lynch, P., y otros. (2007). A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1858-1863.
6. Claesson, M., Jeffery, I., Conde, S., Power, S., Connor, E., Cusack, S., y otros. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 178-184.
7. Cross, M. (2002). signos de inmunidad generados por el probiótico lactobacilo en su papel contra microorganismos patógenos. *FEMS inmunología medica microbiológica Inmunología Medica Microbiológica*. Pubmed, 34:245-53.
8. Farías, M. (2011). *Probióticos Previóticos*. Elsevier.

9. Fedorak, R., & Madsen, K. (2004). Probióticos y prebióticos en desordenes gastrointestinales . Revista de gastroenterología, 146-55.
10. Garcia, M., López de Varona, Y., & Carcassés, Á. (2012). Empleo de probióticos en los animales. Produccion Animal, 33.
11. García, Y., Elías, A., & Herrera, F. (2005). Dinámica microbiana de la fermentación in vitro de las excretas de gallinas ponedoras. Cubana Ciencia Agrícola, 14-156.
12. Gómez, E. (2010). alimentos funcionales aproximación a una buena salud semanario 7 días. Instituto del frio Madrid , 20.
13. González, A. (2010). Bacilos Gram positivos. España: <http://microral.wikispaces.com/Bacilos+Gram+positivos> 2010.
14. Guarner, F. (2007). Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. Nutr Hosp, 17.
15. Hamer, R. (2010). PROBIOTICOS EN ANIMALES. Scribd, 16.
16. Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., & Axelsson, L. (2012). In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. International journal of food microbiology, 153 (1).
17. Jurado, H., Ramírez, C., & Aguirre, D. (2013). Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido. Veterinaria y Zootecnia ISSN 2011-5415 , 38.
18. Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol, 49: 209-224.
19. Kandler, O., & Weiss, N. (1992). Regular nonsporing Gram-positive rods. En M. S. P. H. A. Sneath, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 10th edition, vol. 2 (págs. 208-1260). The Williams and Wilkins Co; Baltimore.

20. Klayraung, S., & Okonogi, S. (2009). Antibacterial and antioxidant activities of acid and bile resistant strains of *Lactobacillus fermentum* isolated from miang. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(4), 757-766.
21. Marlli, A. (2013). USO DE PROBIÓTICOS EN LA NUTRICIÓN DE MONOGÁSTRICOS COMO ALTERNATIVA PARA MEJORAR UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN. UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA UNAD, 31.
22. Mohnl, M. (2011). Microflora gastrointestinal y su influencia en el hospedero. *Invetsa*.
23. Molina, J., & Uribarren, T. (2011). GENERALIDADES DE BACTERIAS. México:
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>.
24. Monroy, M., Castro, T., Fernández, F., & Mayorga, L. (2009). Bacteriocinas producidas por Bacterias probióticas. *Bacteriocinas producidas por Bacterias probióticas*, 63-72.
25. Montoya, A. (2010). Identificación de bacterias por pruebas bioquímicas incompleta. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO , 3-4.
26. Morales, M., Ortiz, E., Villaverde, M., Caballero, V. A., & Miranda, E. (2007). ACTIVIDADES DESARROLLADAS EN LA COLECCIÓN DE BACTERIAS MARINAS. Centro de Bioproductos Marinos (CEBIMAR), AMA, CITMA,, 3.
27. Naidu, A., Bliblack, W., & Clemens, R. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria . *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 39: 13-126.
28. Negrete, J., & Arévalo, M. (2014). ANUARIO CLIMATOLOGICO FACULTAD DE RECURSOS NATURALES ESPOCH. Riobamba:
http://www.esPOCH.edu.ec/Descargas/facultadpub/ANUARIO_2013-1_1393d.pdf.

29. Negroni, C. (2009). Morfología de las colonias bacterianas. Microdon, 1.
30. O'Mahony, L., McCarthy, J., & Kelly, P. (2005). Lactobacillus and Bifidobacterium en síndrome de colon irritable. Gastroenterología, 23.
31. Pineda de Mora, Y. R. (1999). Producción de colicinas, hemolisinas y resistencia a los antimicrobianos en la cepa de Echerichia coli en cerdos con diarrea. Veterinaria Tropical , 87-98.
32. Pino, F. (2012). Características de las bacterias. batanga, 1.
33. Riopérez, J. (2005). Nutrición y patología digestiva del lechón y del cerdo en crecimiento ceba. Disponible en <http://www.cuencarural.com/ganaderia/porcinos/73344-nutricion-y-patologia-digestiva-del-lechon-y-del-cerdo-en-crecimiento-cebo/>. .
34. Rojo, J. (2005). Funciones de los probióticos. Nuevas terapias en el manejo de la enfermedad intestinal, 15.
35. Samaniego, L., & Sosa del Castillo, M. (2002). Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas, 3.
36. Satefanoviciaus, M. (2013). Ajustando Micro Flora Intestinal con Simbióticos – Una Herramienta Eficiente para Controlar la Disbiosis en Aves. Sau Pablo, Barsil: <http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/ajustando-micro-flora-intestinal-t5944/165-p0.htm>.
37. Seija, V. (2002). COCOS GRAM POSITIVOS. Aspectos prácticos, 1-2.
38. Tellez, G., Pixley, C., Wolfenden, R., Layton, S., & Hargis, B. (2012). Probiotics/direct fed microbials . Food Research International, 45(2), 628-633.
39. Valladares, J. (2010). Elementos requeridos para un diagnóstico de Laboratorio. México:<http://www.engormix.com/MA->

avicultura/manejo/articulos/elementos-requeridos-diagnostico-laboratorio-t2905/p0.htm.

40. Vega, E. (2010). Características Fisiológicas Bacterianas. ezoraya, 28.
41. Vélez, J. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias probióticas extraídas del calostro de cerdas de granjas del Aburrá sur. Universidad Nacional de Colombia, 14.
42. Zambrano, A. (2010). Efecto De La Utilización de Diferentes niveles de Probiótico en la Dieta. Universidad Técnica De Manabí, 23.

ANEXOS

ANEXO 1. Resultado microbiológico del aislamiento de microorganismos probióticos de pollos en tres estados fisiológicos.

Respuesta Morfológica de los microorganismos probióticos del estado inicial – ciego de primer ensayo, al estado de crecimiento – ciego del primer ensayo.

Ensayos	Muestras	Características Morfológicas		
		Colonia	Individual	Tintoriales
			Forma	Gram
1	A1B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
1	A1B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
1	A1B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
1	A1B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
1	A1B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
1	A1B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
2	A1B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
2	A1B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
2	A1B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
2	A1B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
2	A1B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
2	A1B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
1	A1B2	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	-
1	A1B2	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	-
1	A1B2	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
1	A1B2	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
1	A1B2	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
1	A1B2	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
2	A1B2	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
2	A1B2	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
2	A1B2	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
2	A1B2	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
2	A1B2	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
2	A1B2	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
1	A2B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
1	A2B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
1	A2B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
1	A2B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	+
1	A2B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	-
1	A2B1	Regular Cremosa, Convexa	Bacilo	-

Respuesta Bioquímica de los microorganismos probióticos del estado inicial – ciego del primer ensayo, al estado de engorde – ciego del primer ensayo.

Ensayos	Muestras	Características Bioquímicas				
		Catalasa	Acidez	Gas	H ₂ S	Movilidad
1	A1B1	-	-	-	+	-
1	A1B1	-	+	-	-	-
1	A1B1	-	+	-	-	-
1	A1B1	-	+	-	-	-
1	A1B1	-	+	-	-	-
1	A1B1	-	+	-	-	-
2	A1B1	-	+	-	-	-
2	A1B1	-	+	+	-	-
2	A1B1	-	+	+	-	-
2	A1B1	-	+	-	-	-
2	A1B1	-	+	-	-	-
2	A1B1	-	+	-	-	-
1	A1B2	-	+	-	-	-
1	A1B2	-	+	+	+	+
1	A1B2	-	+	+	-	-
1	A1B2	-	+	+	-	-
1	A1B2	-	+	-	-	-
1	A1B2	-	+	-	-	-
2	A1B2	-	+	-	-	-
2	A1B2	-	+	-	-	-
2	A1B2	-	+	-	-	-
2	A1B2	-	+	-	-	-
2	A1B2	-	+	-	-	-
2	A1B2	-	+	-	-	-
1	A2B1	-	+	-	-	+
1	A2B1	-	+	-	-	+
1	A2B1	-	+	-	-	+
1	A2B1	-	+	-	-	-
1	A2B1	-	+	-	-	-
1	A2B1	-	+	-	-	-

Respuesta de Virulencia de los microorganismos probióticos del estado inicial – ciego del primer ensayo, al estado de crecimiento – ciego del primer ensayo.

Ensayos	Muestras	Análisis de Virulencia	
		Actividad Hemolítica	Capacidad de coagulación de la leche
1	A1B1	+	+
1	A1B1	+	+
1	A1B1	+	+
1	A1B1	+	+
1	A1B1	+	+
1	A1B1	+	+
1	A1B1	+	+
2	A1B1	-	+
2	A1B1	-	+
2	A1B1	-	+
2	A1B1	-	+
2	A1B1	-	+
2	A1B1	-	+
1	A1B2	-	+
1	A1B2	+	-
1	A1B2	+	+
1	A1B2	-	+
1	A1B2	-	+
1	A1B2	-	+
2	A1B2	-	+
2	A1B2	-	+
2	A1B2	-	+
2	A1B2	-	+
2	A1B2	-	+
2	A1B2	-	+
1	A2B1	+	-
1	A2B1	+	-
1	A2B1	+	-
1	A2B1	+	+
1	A2B1	-	-
1	A2B1	-	-

ANEXO 2. Resultados obtenidos de las Unidades Formadoras de Colonias UFC/ml X10⁸, por regiones y en los diferentes estadios fisiológicos de pollos.

Regiones	Estadio fisiológico		
	Inicial	Crecimiento	Engorde
Ciego	1,53	1,79	3,27
Ciego	2,70	1,34	3,31
Ciego	3,27	3,53	3,31
Ciego	3,01	3,40	1,27
Ciego	2,96	2,49	1,19
Ciego	2,57	1,90	1,34
Ciego	3,48	1,88	1,53
Ciego	2,44	2,29	1,21
Ciego	2,51	1,71	1,43
Colon	2,60	2,05	2,81
Colon	1,92	3,25	2,27
Colon	2,44	3,27	2,36
Colon	3,22	3,14	1,47
Colon	2,99	1,19	1,95
Colon	3,22	1,56	1,64
Colon	1,82	1,56	1,88
Colon	1,66	1,32	1,19
Colon	2,62	1,83	1,14

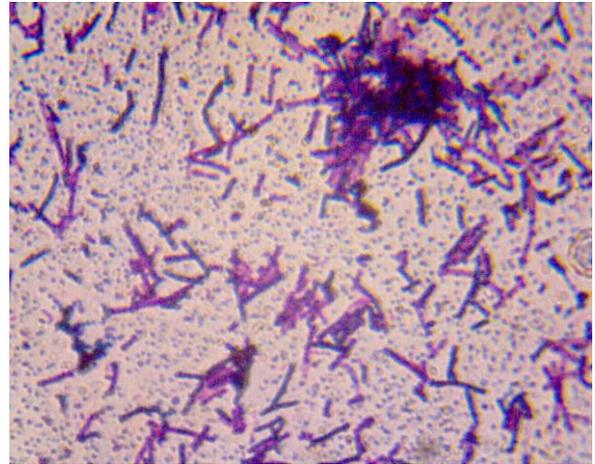
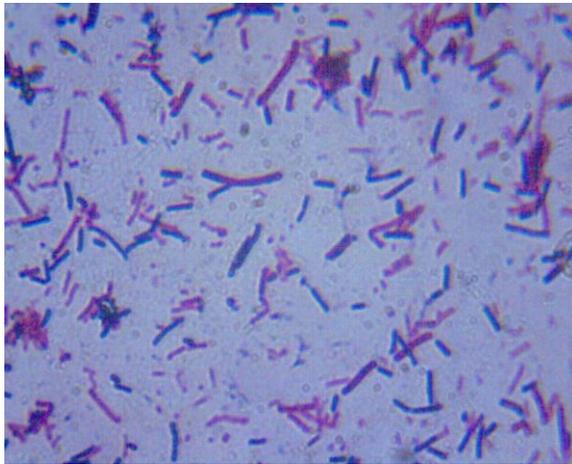
Comparación de medias de las interacciones mediante Tukey con un margen de error al 5%.

Int. AB	Media	Rango
A1B1	2,72	a
A1B2	2,26	a
A1B3	1,98	a
A2B1	2,50	a
A2B2	2,13	a
A2B3	1,86	a

ANEXO 3. Cultivo de la cepa de *Lactobacillus puros*.



ANEXO 4. Imagen de *Lactobacillus*, al microscopio con el objetivo 40x, para observación de Tinción Gram. (A1B1).



ANEXO 5. Evaluación de producción de gas y producción de ácido a partir de la glucosa.

