

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**



**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Desarrollo de un Alimento para Aves adicionado con
Microorganismos Probióticos Encapsulados.**

RUTH NAYELI HERRERA CASTAÑEDA

T E S I S

**Presentado como requisito parcial para
Obtener el Título de:**

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México, 2011.

Micro-Encapsulado de Microorganismos Probióticos

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
DIVISION DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

Desarrollo de un Alimento para Aves adicionado con Microorganismos
Probióticos Encapsulados.

POR

Ruth Nayeli Herrera Castañeda

TESIS

QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN EL COMITÉ DE TESIS PARA
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO EN:
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

APROBADA POR:



Dr. Mario Cruz Hernández

ASESOR



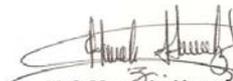
Dr. Heliodoro de la Garza Toledo

VOCAL II



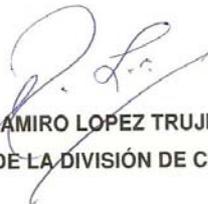
Dr. Antonio Aguilera Carbó

VOCAL II



M.C Marcela Hernández Suárez

VOCAL III



DR. RAMIRO LOPEZ TRUJILLO
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEDICATORIA

A Dios por iluminarme por el camino de la vida y darme paciencia y fuerza para salir adelante.

A mis Padres Andrés Herrera Luna y María del Socorro Castañeda Gaona por ser los seres más grandes del mundo. Por enseñarme el camino del bien dándome siempre los mejores consejos y el mejor ejemplo de comprensión, amor y confianza.

A mis Hermanos Diana Herrera Castañeda y Ernesto Herrera Castañeda por el cariño y apoyo que siempre me han brindado.

A mi Novio Raúl Valdez por los momentos tan bonitos que hemos pasado juntos, por la paciencia y apoyo que siempre me ha brindado. Gracias por estar en mi vida y en mi corazón. Te Amo

A mis Amigas Cecilia Peña, María de Jesús Sánchez, Paola Álvarez, Diana Uresti, Karina Torres y Carmen..... gracias por su amistad y apoyo durante mi carrera.

AGRADECIMIENTOS

A Mi Alma Terra Mater por darme la oportunidad para formarme como profesionalista y ser parte de ella.

A Dr. Mario Cruz Hernández, por su participación y revisión en el presente trabajo.

A Dr. Heliodoro de la Garza Toledo y A Dr. Antonio Aguilera por participar como sinodales en el presente trabajo.

A MC Marcela Hernández Suárez por su participación como sinodal en el presente trabajo.

A mis maestros y compañeros de la Universidad por todo el apoyo y conocimiento que me brindaron durante mi carrera.

A las instalaciones del CEMAP por el apoyo y conocimiento que siempre me brindaron.

INDICE DE CONTENIDO

Índice de Cuadros.....	I
Índice de Figuras.....	II
Indice de Graficas.....	III
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Hipótesis.....	4
Objetivos.....	4
Objetivo General.....	4
Objetivos Generales.....	4
Justificación.....	5
II. Revisión de Literatura.....	6
2.1 Probióticos.....	6
2.2 Microorganismos Probióticos.....	7
2.3 Efectos de los Probióticos en diversas Patologías.....	7
2.3.1 Efectos Nutricionales.....	7
2.3.1.1 Intolerancia a la Lactosa.....	7
2.3.1.2 Reducción de los niveles de colesterol.....	8
2.3.1.3 Efectos protectores.....	8
2.3.1.4 Efectos anticarcinogénicos.....	9
2.3.1.5 Los probióticos inhiben también la proliferación de células tumorales..	10
2.3.1.6 Efectos de los probióticos en patologías gastrointestinales.....	11
2.3.1.6.1 Diarrea aguda.....	11
2.3.1.6.2 Efecto del probióticos sobre la diarrea aguda.....	11
2.3.1.7 Microorganismo Probiotico Bioterapeutico.....	11
2.3.1.8 Diarrea asociada a antibioticos	11
2.3.1.9 Enfermedad inflamatoria intestinal.....	12
Infección por Helicobacter pylori.....	12
2.3.1.10 Propiedades bioterapeuticas.....	12

2.3.2 Usos.....	13
2.3.3 Aplicaciones.....	13
2.4 Aves de Engorda.....	14
2.4.1 Alimentación de las aves de corral.....	14
2.4.1.1 La comida.....	15
2.4.1.2 Fuentes de energía.....	16
2.4.2 Raciones y agua.....	17
2.4.3 Carencias derivadas de una mala alimentación.....	17
2.5 Enfermedades de las aves transmisibles a los humanos.....	18
2.5.1 Clamidiosis	19
2.5.2 Salmonelosis.....	20
2.5.3 Colibacilosis.....	21
2.5.4 Infecciones por Arizona (Arizonosis).....	22
2.5.5 Encefalitis Equina del Este.....	22
2.5.6 Tuberculosis Aviar.....	23
2.5.7 Histoplasmosis.....	23
2.5.8 Criptococosis.....	24
2.5.10 Alveolitis Alérgica.....	25
2.6 Probióticos en Aves de Engorda.....	26
2.6.1. Dieta probiótica para pollos.....	27
2.6. 2 Probióticos y Patógenos.....	28
2.6.3 Efectos beneficiosos del uso de los Bacillus y sus endosporas como Probióticos en aves.....	29
2.7 Encapsulado de Microorganismos Probióticos.....	30
2.7.1 Métodos de Encapsulación.....	30
2.7.1.1 Secado por aspersion.....	31
2.7.1.2 Aspersion por enfriamiento o congelamiento.....	31
2.7.1.3 Extrusion.....	32
2.7.1.4 Cobertura por lecho fluidizado.....	32
2.7.1.5 Atrapamiento en liposomas.....	33
2.7.1.6 Inclusion de complejos.....	33
III. METODOLOGIA.....	35
3.1 Activación de Microorganismos Probióticos.....	35

3.2 Adaptación de jarras de anaerobiosis.....	35
3.3 Preparación de medios de cultivo.....	36
3.3.1 Medio de cultivo líquido. Caldo MRS.....	36
3.3.1.1 Forma de preparación.....	36
3.3.2 Medio Agar MRS.....	37
3.3.2.1. Forma de Preparación.....	37
ETAPA 1: PURIFICACION E IDENTIFICACION DE LAS CEPAS.....	37
3.4 Identificación e Inoculación de las Cepas Probioticas.....	37
3.4.1 Fijar un frotis.....	38
3.4.2 Tinción de Gram.....	38
3.5 Purificación de las Cepas.....	38
3.5.1 Resiembra.....	39
ETAPA 2: CONSERVACION DE CEPAS PROBIOTICAS.....	39
3.6 Congelación.....	39
ETAPA 3. SELECCIÓN DE LAS CEPAS.....	39
3.7 Preparación de inóculo para bacterias patógenas	39
3.7.1 Aislamiento de la bacteria de Salmonella en Pollos de granja.....	40
3.7.1.1. Agar Salmonella-Shigela.....	40
3.7.1.2 Preparación.....	40
3.7.1.3 Siembra.....	40
3.7.2 Obtención de Biomasa de Microorganismos Probióticos.....	40
3.7.3 Prueba contra bacterias Patógenas.....	41
3.7.3.1 Siembra de bacterias patógenas.....	41
ETAPA IV: ENCAPSULADO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS.....	42
3.8 Micro encapsulación.....	42
3.8.1 Cepas seleccionadas.....	42
3.8.2 Procedimiento de Encapsulado.....	42
3.8.2.1 Preparación de material estéril.....	42
3.8.3 Procedimiento de Encapsulado.....	43
3.8.3.4 Esquema del Procedimiento de Encapsulado.....	44
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	45
ETAPA 1: PURIFICACION E IDENTIFICACION DE LAS CEPAS.....	45
5.2 Purificación de Cepas.....	46
5.2.1 Descripción de las cepas.....	46

ETAPA 2: CONSERVACION DE CEPAS PROBIOTICAS.....	47
ETAPA 3. SELECCIÓN DE LAS CEPAS MÁS POTENTES.....	47
5.3 GRAFICAS DE COMPARACION.....	47
5.3.1 INTERPRETACION DE GRAFICAS.....	50
ETAPA IV: ENCAPSULADO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS.....	53
Conclusiones.....	54
Bibliografia.....	55

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Composición química.....	36
Cuadro 2. Composición química.....	37
Cuadro 3. Composición química del agar Salmonella-Shigela.....	40
Cuadro 4 Composición química del Agar Nutritivo.....	41
Cuadro 5 Composición química del Cloruro de Calcio.....	43
Cuadro 6. Identificación de cepas.....	45

Índice de Figuras

Figura 1A: Frasco con medio de cultivo liquido. Figura 1B: Frasco con medio sólido.....	35
Figura 2: Ejemplo placa de agar sembrada con papel filtro.....	41
Figura 3. Cepas Puras.....	46
Figura 4. Cepa: Calabaza contra: Salmonella de pollo.....	51
Figura 5. Cepa: Alfalfa Contra: E.Aerogenes.....	51
Figura 6. Cepa: Suero Contra: S. Aureus.....	52

Índice de Graficas

Grafica 2. <i>E. aerogenes</i> con las 19 cepas probioticas.....	48
Grafica 1. <i>E. coli</i> con las 19 cepas probioticas.....	48
Grafica 3. <i>S. aureus</i> con las 19 cepas probioticas.....	49
Grafica 4. Salmonella de pollo con las 19 cepas probioticas.....	49
Grafica 5. <i>S. typhi</i> con las 19 cepas probioticas.....	50
Grafica 6. Promedio final.....	

RESUMEN

La presente investigación tiene principalmente dos objetivos seleccionar 3 de las diecinueve cepas que presenten mayor alo de inhibición contra bacterias patógenas y lograr el proceso de encapsulado de las mismas cepas.

Para dicho estudio se utilizaron 19 cepas que pertenecen a la colección de microorganismos probióticos de la empresa GBS Global S.A. de C.V, las cuales fueron identificadas de acuerdo a las muestras de donde se obtuvieron y aislaron. Primeramente se identificaron las cepas, por lo que fueron inoculadas en caldo MRS e incubadas en reactores de anaerobiosis a 37° C por 24 horas, para crear el medio óptimo de crecimiento de estos microorganismos. Posteriormente fueron sembradas en placas de Agar MRS, se realizo la técnica de tinción de Gram para poder observar en microscopio y lograr la identificación. Los resultados observados arrojaron morfologías de Bacillos y Cocos para lo cual por lo que se decidió purificar las 19 cepas por la técnica de estriado por agotamiento. Una vez que se observaron cepas puras se utilizo como medio de conservación la congelación, en viales esterilizados. Seguido de esta etapa se llevo acabo la selección de las 3 cepas para lo cual se realizo la prueba de alo de inhibición de las siguientes bacterias patógenas: E.Coli, Salmonella T, Salmonella de pollo, S.Aureus y E.Aerogenes las cuales se mantuvieron inoculadas en Caldo Nutritivo. Para la prueba las bacterias patógenas fueron sembradas en placas de agar MRS se coloco con pinzas 4 papelitos filtro en cada caja remojado en biomasa (resultado de la centrifugación de 45 ml de suspensión de bacterias a 4500 revoluciones por 30 minutos) fueron selladas y incubadas a 28° C por 24 horas.

Las cepas seleccionadas de acuerdo a los resultados fueron Alfalfa (Cocos gram positivos), Calabaza (bacilos gram positivos) y suero (Bacilos gram positivos). Por ultimo se llevo acabo el proceso de encapsulación por el método de extrusión que involucra simplemente la preparación de una solución hidrocoloidal (polímero celular), añadiendo microorganismos a ésta, y extruyendo la suspensión celular a través de una aguja o bureta en la forma de gotas que caen en una solución de endurecimiento o refuerzo.

Palabras claves: Microorganismos probióticos, encapsulado, medios de cultivo, bacterias patógenas, aves de engorda.

I. INTRODUCCION

La producción de animales de granja para consumo humano y su transformación en carne constituye hoy en día, una actividad tradicional y estratégica en la economía.

Esta industria ha tomado gran importancia, ya que es un alimento principal en la dieta alimenticia de la población, sino también por su bajo costo y su fácil manipulación. Por estas razones, la producción de carne constituye uno de los temas más importantes que se deben estudiar y resolver.

El rápido crecimiento de la producción ganadera está realizando una presión cada vez mayor en los recursos naturales. Se necesitan tecnologías para aumentar la eficacia de la transformación de los piensos (alimentos balanceados), reduciendo así los insumos y las pérdidas de nutrientes.

La apropiada nutrición es un componente clave para obtener el éxito en un sistema de producción, pues la alimentación comúnmente es el elemento con mayor influencia en su estructura de costos. Este será además el factor determinante durante el proceso de engorde de las aves, y lo que les permitirá convertirse en adultos de máxima productividad.

Los piensos de las aves tienen que tener un contenido completo de nutrientes para garantizar el buen desarrollo de sus funciones y un crecimiento sano y equilibrado, por eso, deberán tener hidratos de carbono, minerales, vitaminas, proteínas y grasas en las cantidades correctas.

Desde hace algunos años se ha estado restringiendo el uso de algunos antibióticos en la alimentación animal en todo el mundo, debido al incremento en la resistencia bacteriana a los antibióticos y a su efecto residual en los productos de origen animal que pueden ser perjudiciales para el humano.

Sin embargo, no existen estudios científicos que corroboren la resistencia cruzada de los antibióticos como promotores de crecimiento utilizados en la nutrición de las aves con los antibióticos comúnmente utilizados en la terapéutica humana.

En las dos últimas décadas, los probióticos han sido investigados como alternativa para sustituir los antibióticos en la alimentación animal.

Los probióticos son microorganismos vivos que se adicionan a un alimento, permaneciendo activos en el intestino y ejerciendo importantes efectos fisiológicos. Ingeridos en cantidades suficientes tienen efectos muy beneficiosos, como contribuir al equilibrio de la flora bacteriana intestinal del huésped y potenciar el sistema inmunitario. Son capaces de atravesar el tubo digestivo y recuperarse vivos en las heces, pero también se adhieren a la mucosa intestinal

Los denominados productos probióticos parecen ganar crédito a medida que se comprueban los efectos que determinadas bacterias, en especial de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, producen sobre el organismo humano y, como se está viendo ahora, también en el de animales de granja destinados a consumo humano.

Los beneficios que se les atribuyen van más allá de su contribución a la regulación de procesos digestivos. La posibilidad de competir con microorganismos patógenos y limitar el uso excesivo de antibióticos. Los beneficios, aunque todavía de forma experimental, han sido verificados ahora en pollos.

HIPOTESIS

Es posible que algunos microorganismos probióticos puedan inhibir bacterias patógenas y tener un gran beneficio en la flora gastrointestinal en aves así como poder lograr el encapsulamiento de estos microorganismos sin cambiar su morfología y estructura.

OBJETIVOS

Objetivo General

Es encapsular microorganismos probióticos y evaluar su efecto benéfico en la flora gastrointestinal en pollos de engorda.

Objetivos Generales

- Lograr la conservación de los microorganismos probióticos.
- Seleccionar las cepas más potentes contra bacterias patógenas.
- Encapsular los microorganismos probióticos.
- Obtener un producto de buena calidad.
- Realizar pruebas con pollos para así poder evaluar su desarrollo

JUSTIFICACION

En la actualidad hay una preocupación progresiva sobre patógenos alimenticios que se transmiten desde los animales de granja hacia la población humana, es por eso que las industrias y los laboratorios de investigación han buscado las aplicaciones de microorganismos probióticos en animales.

El uso de los probióticos encapsulados es una alternativa natural para mejorar el funcionamiento del metabolismo animal y controlar la microflora gastrointestinal en pollos, que a la fecha ha demostrado resultados muy favorables.

Hoy en día modernas granjas utilizan dietas alimenticias (a base de probióticos) que disminuyen el estrés, aumentan la microflora intestinal, lo que conlleva al animal a aumentar su resistencia a las infecciones (sistema inmunológico), mejorar la salud animal, rendimiento en peso y funcionamiento metabólico.

Por esta razón el actual estudio fue realizado para evaluar el encapsulamiento de microorganismos probióticos para obtener un alimento que ofrecería no solamente las ventajas de un alimento de alta calidad, sino también un producto con las ventajas de tener probióticos incorporados y dar una alternativa mas para los productores.

II. REVISION LITERARIA

2.1.- Probióticos

Definición

Élie Metchnikoff (1845-1916) fue un zoólogo y microbiólogo ruso que, Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1908. Logró aislar la bacteria responsable de la producción del yogur y la utilizó para sus investigaciones. Era el inicio oficial de la Probiótica.

Metchnikoff se volvió un firme defensor del concepto que la dieta puede proteger el cuerpo de la invasión de patógenos y en consecuencia mejorar y prolongar la calidad de vida. Fue la primera persona en desarrollar un preparado terapéutico utilizando lactobacilos en forma de cápsula para ingerir oralmente denominado Lactobacillin.

En 1965 Lilly y Stillwell utilizaron por primera vez el término de Probiótico, para nombrar a los productos de la fermentación gástrica. Esta palabra se deriva de dos vocablos, del latín -pro- que significa por o en favor de, y del griego – bios- que quiere decir vida.

Esta definición fue modificada y se redefinió el término de Probióticos como microorganismos y compuestos que participan en el balance y desarrollo microbiano intestinal. En 1989 R. Fuller definió a los Probióticos como: "Aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino"

Y en 1998 el ILSI (International Life Science Institute, de la Unión Europea) en Bruselas definió a los Probióticos como microorganismos vivos, que cuando son ingeridos en cantidades suficientes, tienen efectos beneficiosos sobre la salud, lo que va más allá de los efectos nutricionales convencionales. Afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo. Proporcionan un mejor estado de salud y bienestar y/o reducen el riesgo de enfermedad. Hay que mencionar que, para ser considerada como Probiótica, una bacteria tiene que sobrevivir el medio fuertemente ácido del estómago y colonizar el intestino delgado y grueso.

2.2 MICROORGANISMOS PROBIOTICOS

- Lactobacillus acidophilus
- Lactobacillus casei var. Shirota
- Lactobacillus fermentum
- Lactobacillus casei
- Lactobacillus crispatus
- Lactobacillus reuteri
- Lactobacillus rhamnosus
- Lactobacillus plantarum
- Lactobacillus bulgaricus
- Lactobacillus cellobiosus
- Lactobacillus curvatus
- Lactobacillus lactis cremoris
- Lactobacillus GG
- Bifidobacterias
- Bifidobacterium longum
- Bifidobacteria adolescentis
- Bifidobacteria animalis
- Bifidobacteria infantis
- Bifidobacteria bifidum
- Streptococcus salivaris
- Streptococcus faecium
- Streptococcus diacetylactis
- Streptococcus intermedius
- Saccharomyces boulardii

2.3 EFECTOS DE LOS PROBIOTICOS EN DIVERSAS PATOLOGIAS

Los efectos de los Probióticos son varios incluyendo la modificación de la flora evitando la colonización patógena, la prevención del desequilibrio de la flora intestinal, la reducción de la incidencia y duración de diarreas, el mantenimiento de la integridad de las mucosas, la modulación de la inmunidad al evitar la translocación bacteriana, la producción de vitaminas como la B2, B6 y biotina, la asimilación de oligoelementos y la actividad antitumoral.

2.3.1 Efectos Nutricionales

2.3.1.1 Intolerancia a la lactosa

Alrededor del 70% de la Población mundial, presenta intolerancia a la lactosa, relacionada con la disminución de la actividad de la lactasa en la mucosa intestinal, genéticamente determinada. La Lactosa no digerida es fermentada

por la flora intestinal, con producción de agua, ácidos grasos y gas, que ocasionan síntomas como dolor abdominal, flatulencia y diarrea.

Los Probióticos contribuyen a mejorar la digestión de la lactosa y reducen la sintomatología por la mala absorción, gracias a que los *Lactobacillus* poseen una actividad enzimática (lactasa) que sigue funcionando en el intestino y permite la digestión del azúcar, lo cual permite que personas con intolerancia a la lactosa puedan consumir leche, fuente rica en proteínas, vitaminas y calcio; evitando los eventuales síntomas como la diarrea, dolor abdominal, flatulencia, etc.

Los Probióticos que actúan en la fermentación del yogur como *Lactobacillus bulgaricus* y *S. thermophilus* poseen la enzima. Los *Lactobacillus* y las bifidobacterias poseen un efecto favorecedor en la digestión de la Lactosa

2.3.1.2 Reducción de los niveles de colesterol

Algunos Probióticos pueden ejercer efectos hipocolesteromiantes, es decir que contribuyen a la disminución del colesterol sanguíneo de tres maneras distintas:

- A. Utilizando el colesterol en el intestino y reduciendo así su absorción
- B. Aumentando la excreción de sales biliares
- C. Produciendo ácidos grasos volátiles en el colon que pueden ser absorbidos e interferir con el metabolismo de los lípidos en el hígado.

2.3.1.3 Efectos protectores

Los Probióticos son microorganismos que estimulan las funciones protectoras del tracto digestivo, también son conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos, se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales. Para que un microorganismo pueda cumplir con esta función de protección tiene que poseer características tales como: Ser habitante normal del intestino, tener un tiempo corto de reproducción, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que pueda estar vivo en el intestino.

La protección de estos microorganismos se lleva a cabo mediante dos mecanismos: El antagonismo que impide la multiplicación de los patógenos y la producción de toxinas que impiden su acción patogénica. Este antagonismo esta dado por la competencia por los nutrientes o los sitios de adhesión. Mediante la inmunomodulación protegen al huésped de las infecciones induciendo a un aumento de la producción Inmunoglobulinas, aumento de la activación de las células mononucleares y de los linfocitos.

Las bacterias ácido lácticas pueden colonizar transitoriamente el intestino y sobrevivir durante el tránsito intestinal además, por su adhesión al epitelio, modifican la respuesta inmune local del hospedero.

Ciertos Probióticos pueden estimular la inmunidad del individuo tanto a nivel intestinal como a nivel general, lo cual se traduce por una mayor producción de anticuerpos y una mejor defensa. Varios estudios sugieren que el consumo de Probióticos podría ayudar a regular las alteraciones del sistema inmune que se observan en casos de alergia y por lo tanto, a reducir los síntomas asociados con esta patología.

Ciertas bacterias lácticas protegen al intestino frente a los patógenos de diferentes maneras:

- A. Compitiendo por el espacio físico y por los nutrientes
- B. Produciendo sustancias antibióticas activas frente a estos patógenos
- C. Estimulando el sistema inmune del intestino
- D. Contribuyendo a la acidificación del contenido del colon, lo cual es desfavorable para el crecimiento de patógenos
- E. Inactivación de ciertas toxinas liberados por patógenos.

2.3.1.4 Efectos anticarcinogénicos

Los Probióticos parecen tener actividad anticarcinogénica mediante la producción de determinadas sustancias durante su crecimiento, que actuarían disminuyendo las sustancias procarcinogénicas por acción directa sobre las mismas. Un ejemplo conocido es el paso de nitritos en alimentos a nitrosaminas, sustancias carcinogénicas. Las lactobacterias son capaces de actuar tanto química como enzimáticamente sobre los nitritos, y las

bifidobacterias son capaces de desdoblar a las nitrosaminas. Por consiguiente, estos microorganismos Probióticos disminuyen las sustancias carcinogénicas.

También las sales biliares secundarias procedentes de la degradación de la bilis se han relacionado como sustancias iniciadoras del cáncer de colon. En este sentido, se considera que un alto número de lactobacilos en el intestino pueden reducir la biotransformación de las sales biliares y por tanto disminuir el riesgo de sufrir este tipo de cáncer.

Los Probióticos pueden actuar sobre las sustancias procarcinogénicas indirectamente a través del sistema enzimático que transforma los procarcinogénicos en carcinogénicos. Se ha visto que el consumo de Probióticos causa un descenso de las enzimas que realizan el paso de procarcinogénicos a carcinogénicos, resultando en consecuencia una disminución de sustancias carcinogénicas.

2.3.1.5 Los probióticos inhiben también la proliferación de células tumorales

Los Probióticos no poseen únicamente una acción anticarcinogénica, sino que además, muestran una acción antagonista sobre la proliferación de células tumorales quizás debido a una estimulación del sistema inmune tanto a nivel local (intestino), como a nivel sistémico o general. En este sentido, experimentos con animales alimentados con yogur han dado como resultado un aumento del porcentaje y actividad antibacteriana de los linfocitos B.

Los resultados de diversos estudios llevados a cabo por *Ian Rowland* y colaboradores (1998), de la Escuela de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Ulster, en Irlanda del Norte, confirman cómo los principios Probióticos pueden influir positivamente en la reducción de la incidencia de tumores humanos. En sus experimentos con ratas han observado que la administración conjunta de lactobacilos o bifidobacterias y azoximetano, un agente carcinogénico de colon, reduce en estos la incidencia de focos de cáncer. Incluso, la combinación de bifidobacterias e inulina, sustrato para el crecimiento de bifidobacterias, ha demostrado ser más efectiva que cualquiera de los dos tratamientos por sí solos. En estos estudios, los tratamientos dietéticos se

suministraban después de una exposición a carcinógenos, de donde se deriva la sugerencia de que durante la fase de activación del proceso carcinogénico se estaba ejerciendo un efecto protector

2.3.1.6 Efectos de los probióticos en patologías gastrointestinales

2.3.1.6.1 Diarrea aguda

La diarrea modifica la función Normal del Tracto gastrointestinal como: la Digestión, absorción e inmunomodulación, para combatir las diarreas se usan estrategias como las antibioterapias, que lleva implícito el riesgo de desarrollo de Resistencia y disminución de la flora No patógena. El uso de Probióticos representa una alternativa prometedora en la prevención y tratamiento de diarreas

2.3.1.6.2 Efecto del probióticos sobre la diarrea aguda

- Producción de Sustancias Antibacterianas: Bacteriocinas, Lactocinas, Helveticinas, Bifidinas
- Producción de Acidos Grasos que acidifican el lumen intestinal, inhibiendo bacterias y manteniendo el buen funcionamiento de la mucosa intestinal.
- Disminución de la Permeabilidad Intestinal
- Acción Competitiva
- Inmunomodulación Aumento de la Ig A, Regulación de Citocinas y de la respuesta inmunitaria.

2.3.1.7 Microorganismo Probiotico Bioterapeutico

Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus LGG, Bifidobacterium, S. thermophilus, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus delbruckii

2.3.1.8 Diarrea asociada a antibióticos

El uso de antibióticos puede producir diarrea, al alterar el equilibrio de la flora intestinal con descenso de los Lactobacillus y Bifidobacterias, que son los responsables de la resistencia a la colonización por patógenos, produciéndose infecciones por microorganismos oportunistas como:

- Clostridium difficile
- Klebsiella oxytoca
- perfringens
- S. aureus
- Candida sp.
- Salmonella sp.

2.3.1.9 Enfermedad inflamatoria intestinal

La predisposición genética, las alteraciones inmunológicas y las bacterias patógenas interactúan como agentes desencadenantes y perpetuadores de la enfermedad inflamatoria intestinal.

La administración de Probióticos empleada como una terapia de antagonismo bacteriano, es capaz de desplazar a las bacterias con potencial patógeno, con el subsiguiente aumento de bifidobacterias, modificando favorablemente la exagerada respuesta inflamatoria, mejorando el epitelio intestinal y disminuyendo sus síntomas.

Probióticos con efecto bioterapéutico:

Lactobacillus reuteri, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis, Bifidobacterium adolescentis, Saccharomyces boulardii

Infeción por Helicobacter pylori

Patógeno Gram-negativo responsable de la gastritis, úlcera péptica y cáncer gástrico. Estudios in vitro y en humanos han demostrado que los Probióticos poseen un efecto antagónico contra H. Pylori, inhibiendo su colonización gástrica e impidiendo el desarrollo de la patología relacionada, inhiben la actividad de la enzima ureasa, necesaria para que el patógeno permanezca en el ambiente ácido estomacal.

2.3.1.10 Propiedades bioterapéuticas

- Prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas
- Disminución de los niveles de colesterol.
- Disminución de diarreas, ya sea por virus, bacterias o parásitos.

- Tratamiento de la intolerancia a la Lactosa, actúa en la digestión de la lactosa
- Estimulación del sistema inmune.
- Exclusión o reducción de la adherencia patógena
- Persistencia y multiplicidad.
- Producción de ácidos, peróxido de Hidrógeno y bacteriocinas antagonistas al crecimiento patógeno.
- Formación de una flora intestinal balanceada.
- Prevención de ciertas manifestaciones alérgicas
- Prevención del cáncer de Colon
- Tratamiento contra tumores
- Poseen efectos antimicrobianos.
- Poseen la habilidad de adherirse a las células

2.3.2 Usos

Estas bacterias son empleadas en la elaboración de productos lácteos fermentados, entre los que se incluyen los yogures, verduras fermentadas, carne y productos de leche fermentada. los cuales son comercializados con el slogan de que «generan un balance de la flora intestinal». Las bifidobacterias son habitantes normales en el tracto intestinal, generalmente se encuentran en cantidades superiores a 10 por cada gramo de contenido intestinal, comprenden cerca del 25% de la microflora, sin embargo la cantidad de bacterias va disminuyendo con la edad (Hopkins et al., 1998). Caracterizadas generalmente como gram-positivas, existen alrededor de 30 especies incluidas en el género *Bifidobacterium*, que fueron aisladas de fuentes humanas (caries dental, heces fecales y vagina).

2.3.3 Aplicaciones

En el mercado existe una variada oferta de productos lácteos fermentados (el más conocido en esta categoría es el yogur –leche fermentada por la acción de las bacterias *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*), que, si se incorporan en la dieta normal, pueden restablecer o mantener ese equilibrio bacteriano, pues su composición incluye la presencia de diferentes colonias de bacterias benéficas.

Sin embargo, el desarrollo tecnológico ha dado origen a la aparición de las bebidas lácteas fermentadas, las cuales también se venden bajo las denominaciones "alimento lácteo fermentado" o "producto lácteo fermentado". Estos productos, además de que ofrecen agregar diversas bacterias benéficas –y con ello favorecer el equilibrio de las poblaciones bacterianas de nuestra flora intestinal–, son de fácil digestión y producen ácido láctico, que impide la proliferación de bacterias nocivas y la putrefacción de sustancias en el colon; tienen también la facultad de sobrevivir a través del sistema digestivo y, en varios casos, de reproducirse. Ejemplos de éstas son las bifidobacterias *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus casei* Shirota; a todas ellas también se les denomina con el nombre genérico de “probióticos”.

2.4 Aves de Engorda

2.4.1 Alimentación de las aves de corral

Criar patos y gallinas para que produzcan huevos y carne de calidad dependerá de unos buenos piensos que tengan los elementos nutritivos necesarios.

Las aves carecen de dentadura, por eso la comida entra entera a su organismo. Es el buche el aparato que se encarga de salivar la comida y el estómago, el que mezcla los alimentos con los jugos gástricos. En la molleja se produce el siguiente paso: en ella hay piedrecitas que el ave ha tragado previamente y que le ayudan a moler la comida. Los nutrientes se absorben cuando los alimentos llegan al intestino.

La apropiada nutrición es un componente clave para obtener el éxito en un sistema de producción de ganado de carne, pues la alimentación comúnmente es el elemento que tiene mayor influencia en su estructura de costos. Este será además el factor determinante durante el proceso de engorde de los becerros, y lo que les permitirá convertirse en adultos rumiantes de máxima productividad.

2.4.1.1 La comida

Los piensos de las aves tienen que tener un contenido completo de nutrientes para garantizar el buen desarrollo de sus funciones y un crecimiento sano y equilibrado, por eso, deberán tener:

- Hidratos de carbono
- Minerales
- Vitaminas
- Proteínas
- Grasas

Las cantidades establecidas de pienso varían a lo largo de la vida del animal. De hecho, una gallina o un pato que se va a destinar a carne, requieren abundante proteína en su dieta, aunque no es bueno darles demasiada proteína animal. Por otro lado, las gallinas ponedoras necesitan minerales para producir huevos.

Las semillas (de trigo, maíz, cebada, arroz, avena, sorgo, etc.) enteras o en harinas, suministran carbohidratos de calidad a las aves. La proteína vegetal puede obtenerse de las semillas de soja, algodón, frutos secos y dátiles. La grasa se encuentra en las pipas de girasol, las semillas de girasol y el cacahuete.

Para garantizar una cantidad correcta de vitaminas, los vegetales verdes y hierbas añadidas al pienso serán más que suficiente para que no les falte este tipo de nutrientes. Buenas fuentes de minerales son la cáscara de huevo y los caparazones del marisco que, triturados, pueden suministrar gran cantidad de calcio, fundamental para las gallinas ponedoras. Mucha gente de campo incluye, además, en la dieta, restos de alimentos utilizados en la cocina. Una buena opción siempre y cuando se corten, se hiervan y se mezclen después con harina.

Las aves jóvenes, pollitos o patitos, necesitan, sobre todo, proteínas para poder desarrollarse adecuadamente, mientras que las gallinas ponedoras son

las que necesitan más comida. En general, las aves se nutren sobre todo de cereales.

Lo que más requieren todas las aves de corral, ya sean pavos, gallinas, patos o gansos, son buenas cantidades de grano entero y molido, que les suministre todos los hidratos de carbono necesarios. Las raciones se mezclarán bien, incorporando agua para que el pienso adquiera un aspecto granuloso, similar al del trigo.

2.4.1.2 Fuentes de energía

Los alimentos que se pueden utilizar como fuentes de energía son principalmente los granos de cereales (maíz blanco o amarillo, sorgo, arroz, trigo, cebada o quinoa).

También se pueden utilizar subproductos como el salvado de maíz, de trigo o pulido de arroz, aunque su empleo debe ser limitado, por contener mucha fibra. El cereal combinado con harina de yuca puede constituir una buena fuente de energía.

La harina deshidratada de plátano verde es también utilizada como fuente de energía, así como la papa cocida y molida.

La melaza de caña puede utilizarse en forma limitada, no más del 10%, porque provoca diarreas.

Ejemplo:

PRE-mezcla de alimento para pollos de engorda

MARCA: ALC M FINPOLLO

REG. S.A.G.A.R.P.A A-6932-017

ALCOM

Proteína	MIN	8.0%
Grasa	MIN	3.5%
Fibra	MAX	3.5%
Cenizas	MAX	8.0%
Humedad	MAX	13.0%
E. L. N		54.0%

INGREDIENTES: Sorgo, soya integral, pasta de soya, harina de pescado, pasta de canola, premezcla de vitaminas y minerales, metionina, lisina, sal, pigmentos naturales, coccidiostato, carbonato de calcio, ortofosfato.

2.4.2 Raciones y agua

Las aves jóvenes, pollitos o patitos, necesitan, sobre todo, proteínas para poder desarrollarse adecuadamente, mientras que las gallinas ponedoras son las que necesitan más comida. En general, las aves se nutren sobre todo de cereales.

Lo que más requieren todas las aves de corral, ya sean pavos, gallinas, patos o gansos, son buenas cantidades de grano entero y molido, que les suministre todos los hidratos de carbono necesarios. Las raciones se mezclarán bien, incorporando agua para que el pienso adquiera un aspecto granuloso, similar al del trigo. Esparcir semillas por el gallinero es un buen modo de conseguir que las gallinas picoteen por el suelo, adquiriendo minerales y piedrecillas, necesarias para la digestión. El pienso sobrante es mejor retirarlo.

Es muy importante que las aves tengan agua limpia siempre: cinco gallinas consumen entre un litro y litro y medio de agua, cantidades que tendremos que doblar en verano. Por su parte, los patos necesitan bastante más líquido, no sólo para beber, sino para introducir la cabeza y el cuello, y poder así refrescarse.

2.4.3 Carencias derivadas de una mala alimentación

Si un ave no recibe todos los nutrientes que necesita empezará a manifestar problemas de salud. Saber reconocerlos a tiempo e identificarlos, nos servirá para darnos cuenta del alimento que le falta a las aves.

- **Proteína:** cuando carecen de este nutriente, las aves crecen menos, **ponen pocos huevos** y pueden sufrir infecciones.

- **Minerales:** se resiente la puesta de huevos (sin cáscara, cáscara muy fina, las gallinas se comen los propios huevos, lo que puede acabar convirtiéndose en un hábito), los huesos de las patas pueden llegar a curvarse. Las cáscaras de huevo machacadas en el pienso es la mejor medicina para solventar la falta de calcio.
- **Vitaminas:** debilidad, plumas erizadas, lento crecimiento, los dedos se curvan hacia dentro, exudaciones en nariz y ojos, además las aves pueden picarse entre ellas si faltan vitaminas. Las plantas verdes solventarán este problema, aunque también existen productos comerciales

2.5 Enfermedades de las aves transmisibles a los humanos.

Los productores de pollo y gallinas así como aves para cacería deben estar consientes que algunas enfermedades de las aves pueden ser transmitidas a los humanos. Es importante hacer notar, sin embargo, que tales enfermedades no son tan comunes como para desalentar a los productores de aves. Para la mayoría de la gente las enfermedades de las aves no son cosa seria, pero los productores de aves deben de estar alertas y buscar asistencia medica si es necesario.

Zoonosis se refiere ha enfermedades infecciosas de animales que se pueden transmitir a los humanos. Los agentes infecciosos pueden ser protozoarios, hongos, bacterias, clamidias o virus. La susceptibilidad individual y la seriedad de estas infecciones por microbios varia con la edad, estado de salud, estado inmunitario y aun cuando la intervención de terapia temprana es solicitada. La habilidad de los microorganismos para hacer que una persona se enferme varia de acuerdo a la virulencia del organismo, las dosis a la cual la persona es expuesta, así como la ruta de infección.

La clamidiosis, salmonelosis, arizonosis y colibacilosis son las infecciones más comunes. clamidiosis, salmonelosis encefalitis equina del este y tuberculosis aviar pueden ser enfermedades muy serias y aun de tratamiento de por vida.

2.5.1 Clamidiosis

Chlamydia psittaci, es una bacteria inusual del organismo, existe a escala mundial y afecta a más de 100 especies de aves. Causa una enfermedad llamada ornitosis cuando ocurre en aves y humanos.

En los EU, la clamidiosis es un gran problema en pavos, palomas y pericos. En Europa las principales especies atacadas son los patos y los gansos. Algunas aves son extremadamente susceptibles a la clamidiosis (pavos), mientras que otras son más resistentes (pollos).

La clamidiosis es principalmente transmitida por inhalación de polvo fecal contaminado y es diseminado por aves portadoras, que actúan como reservorios principales de la enfermedad. El organismo es excretado en las heces y secreciones nasales. Un estado de portador sano puede persistir por años. El organismo sobrevive al secado, que facilita la diseminación oral y permite la transmisión de ropa y equipo contaminado. La clamidiosis puede ser transmitida de ave a ave, heces a ave, y ave a humano. La transmisión de humano a humano puede ocurrir, principalmente por la exposición de la saliva de los pacientes.

Clamidiosis es considerada como de riesgo para personas que trabajan con pericos y palomas, o para gente trabajando con pavos en plantas de matanza y laboratorios de diagnóstico avícola.

El periodo de incubación para clamidiosis es de 4-15 días, aunque 10 días es lo más común. En aves afectadas, es común la presencia de síntomas como la diarrea, tos y descargas nasales y oculares. Puede haber una alta tasa de mortalidad si la enfermedad no es tratada. En pavos hay una caída de la producción de huevo. En humanos, se manifiesta como enfermedad respiratoria febril. Hay una presencia repentina de escalofríos, dolor muscular y articulaciones, dolor de cabeza, tos, pérdida de apetito, y dolor de pecho. Complicaciones pueden originar inflamación del bazo, inflamación del músculo cardíaco, y disminución del ritmo cardíaco.

Las aves afectadas deben tratarse con clorotetraciclina u otro antibiótico de amplio espectro similar por 45 días para eliminar la infección. Las palomas y pavos deben tener mas tiempo de tratamiento para eliminar los portadores.

Los humanos afectados son tratados con tetraciclinas por un periodo de 21 días. Debido a que este antibiótico puede ligarse irreversiblemente a ciertos minerales, el contenido de calcio de la dieta debe mantenerse bajo durante el tratamiento.

En el estado de Florida, la clamidiosis es reportada como enfermedad zoonotica. El Departamento de Agricultura y Servicios al Consumidor debe ser notificado si se encuentran aves infectadas con *Chlamydia psittaci*. Si una persona se sospecha que tenga ornitosis, debe de notificarse en la oficina de salud dentro de 48 horas.

2.5.2 Salmonelosis

Existen aproximadamente 200 serotipos de la especie *Salmonella*. La mayoría de los animales son susceptibles la infección por salmonela. Esta enfermedad bacteriana ocurre mas frecuentemente en individuos estresados. Muchas infecciones son subclínicas. Los síntomas mas comunes en todas las especies son diarrea, vomito, fiebre leve. La infección puede originar deshidratación, debilidad, y algunas veces la muerte especialmente en los muy jóvenes o en los muy viejos. En casos muy severos puede haber fiebre alta, septicemia (envenenamiento de la sangre), dolor de cabeza, y enlargamiento del bazo. Las infecciones pueden incluir cualquier órgano incluyendo el corazón, riñones, articulaciones, meninges (membranas que rodean y protegen el cerebro y la espina dorsal), y el periostio (membrana fibrosa de tejido conectivo que envuelve todos lo huesos excepto las articulaciones).

El periodo de incubación es de 6-72 horas, aunque de 12-36 es lo más común. La salmonela es transmitida por la ingestión o comida contaminada por materia fecal (ruta fecal-oral). La excreción de la bacteria comúnmente varia entre unos días y semanas. En algunos casos, (*S. typhi*, fiebre tifoidea) las personas infectadas pueden ser portadores de la bacteria de por vida, *S. enteritidis* en la

materia fecal de las aves puede penetrar los cascarones del huevo, y puede estar presente en huevos sin cocinar.

En la mayoría de casos, el tratamiento de la salmonelosis simplemente se trata con fluidos y electrolitos. Antibióticos como el cloranfenicol, nitrofuranos, o ampicilinas son solamente cuando la bacteria ha sido localizada en áreas de la superficie corporal del tracto intestinal.

En el estado de Florida, la salmonelosis es reportada como enfermedad zoonótica. El Departamento de Agricultura y Servicios al Consumidor debe ser notificado si se encuentran aves infectadas con especies *Salmonella*. Si una persona se sospecha que tenga salmonelosis, debe notificarse en la oficina de salud dentro de 48 horas.

2.5.3 Colibacilosis

La colibacilosis es causada por una infección de *Escherichia coli*. *E. coli* es una bacteria que normalmente habita el tracto intestinal de todos los animales. Existen un número de diferentes estirpes, muchas especies específicas. No todas las estirpes son patógenas. En aves de corral las infecciones por *E. coli* pueden causar septicemia, enfermedad crónica respiratoria, sinovitis (inflamación de las articulaciones que pueden originar cojera), pericarditis (inflamación del saco que rodea al corazón), y salpingitis (inflamación del oviducto). Los humanos con colibacilosis usualmente manifiestan diarrea que puede complicarse con otros síndromes dependiendo del serotipo de *C. coli*. Estas complicaciones pueden incluir fiebre, disentería, shock, y púrpura (pequeñas hemorragias múltiples en la piel y en las membranas de las mucosas). El periodo de incubación es de 12 horas a 5 días, aunque lo más común es de 12-72 horas. La transmisión es vía fecal-oral. En la mayoría de los casos, en el tratamiento sintomático se requiere de fluidos y antidiarreicos. En infecciones más severas, los antibióticos tales como la tetraciclina y cloranfenicol pueden ser necesarios.

En Florida, colibacilosis no es una enfermedad zoonótica reportada.

2.5.4 Infecciones por Arizona (Arizonosis)

Las infecciones por Arizona son causadas por la bacteria *Salmonella arizona*. *S. arizona* se encuentra alrededor del mundo. Se presenta mas frecuentemente en los reptiles y las aves, pero todos los animales son probablemente susceptibles. Los mas jóvenes tienen mayor riesgo.

En muchas especies de aves la infección por *S. arizona* resulta en una baja producción de huevo e incubabilidad. Los pollos muestran debilidad, anorexia y escalofríos. Las epidemias en pavos, pollos y canarios llegan hasta 60% de mortalidad. En humanos, la diarrea es mas común. Muchas infecciones son subclínicas.

El periodo de incubación es de 6-72 horas, aunque 12-36 es lo mas común. La transmisión es por vía fecal-oral. Puede existir alguna transmisión por medio de los huevos. Las aves infectadas pueden ser portadoras por mucho tiempo, numerosos antibióticos pueden reducir la mortalidad, pero no eliminan la bacteria de los intestinos. *S. arizona* es menos dura que la salmonela pero puede sobrevivir por meses en el suelo, alimento o agua.

En Florida, la infección por Arizona no es una enfermedad zoonotica reportada.

2.5.5 Encefalitis Equina del Este

La encefalitis equina del este (EEE) es causada por un virus RNA del genero *Alphavirus*, familia *Togaviridae*, las epidemias pueden ocurrir en faisanes criados comercialmente, pollos, codorniz, patos, pavos, y emus. Distensión abdominal y disentería son los síntomas más comunes.

La EEE es llevada por un mosquito. El virus circula en un ciclo de mosquito-ave en las golondrinas y pájaros cantadores son el reservorio más común. Los mosquitos se infectan y contaminan alimento de los pájaros, caballos y humanos, difundiendo la infección. En faisanes, la infección inicial es originada por un mosquito, pero la diseminación ocurre por picarse unos a otros y por canibalismo.

Muchas epidemias ocurren entre agosto y la primera helada. También pueden ocurrir casos anuales en áreas como florida que tiene una estación prolongada de mosquitos.

La EEE usualmente afecta a personas entre 15 y más de 50 años de edad. En adultos se presenta una fiebre alta espontánea, dolor de cabeza, vomito, y

letargo, progresando rápidamente en rigidez del cuello, convulsiones, delirio y coma. En niños, la EEE es típicamente manifestada por fiebre, dolor de cabeza y vomito por 1-2 días. Después de una aparente mejoría, se produce una encefalitis (inflamación del cerebro) caracterizada por una aparición rápida y grandes complicaciones. Niños retardados u otras consecuencias neurológicas permanentes son comunes los sobrevivientes. En Florida, la infección por EEE no es una enfermedad zoonotica reportada.

2.5.6 Tuberculosis Aviar

La tuberculosis aviar es causada por la bacteria *Mycobacterium avium* que esta estrechamente muy relacionada con la bacteria de tuberculosis de los humanos y los bovinos. En aves, *M. avium* causa una enfermedad debilitante crónica con nódulos tuberculares. En humanos, las infecciones por *M. avium* pueden causar infecciones locales con nódulos linfáticos inflamados en ciertas regiones. La infección es mas severa en individuos inmunocomprometidos. *M. Avium* es diseminada por ingestión de comida o agua contaminada por heces de aves que lo diseminan. Los animales con tuberculosis deben eliminarse.

Mientras que muchas infecciones por *Mycobacterium* se tratan con antibióticos, *M. Avium* es la excepción ya que es altamente resistente a antibióticos. La operación de para remover los nódulos linfáticos es frecuentemente necesaria para eliminar la infección.

En Florida, la tuberculosis aviar es reportada como enfermedad zoonotica para los animales y la salud. El Departamento de Agricultura y Servicios al Consumidor, debe ser notificado de aves contaminadas con *Mycobacterium avium*. Si se sospecha que una persona esta contaminada con tuberculosis, debe notificarse a la oficina publica del condado en 48 horas.

2.5.7 Histoplasmosis

Algunos hongos prefieren crecer en el suelo enriquecido con heces de pollo. *Histoplasma capsulatum* es una de ellas. Los hongos también están asociados con la construcción de sitios y cuevas. Las aves no son susceptibles a la infección, pero los humanos si pueden ser afectados por histoplasmosis, gatos, perros, bovinos, caballos, y muchos mamíferos salvajes.

El periodo de incubación es de 7-14 días. La mayoría de los casos en humanos son asintomáticos. La enfermedad puede ser manifestada de tres formas: daño pulmonar (el mas común), cavidad pulmonar crónica, y diseminación. El daño pulmonar es como la influenza y puede durar varias semanas. Es caracterizada por escalofríos, dolor de pecho, tos, malestar y fiebre. La forma crónica ocurre en gente de mas de 40 años y se parece a la tuberculosis. Es caracterizada por tos productiva, mas una mas de saliva (material expulsado de los pasajes respiratorios), perdida de peso, y problemas para respirar. La forma diseminada ocurre en los mas jóvenes o en los viejos. Las lesiones incluyen crecimiento de bazo e hígado, y ulceración de la mucosa. La forma diseminada de histoplasmosis puede ser fatal sino se trata. Anfotericina B ha sido utilizada para el tratamiento.

La transmisión ocurre por inhalación de las esporas producidas por el crecimiento del moho. Esta enfermedad no es contagiosa. El reservorio es el suelo, especialmente cuando se enriquece con heces de aves o murciélagos. Humedezca el área y utilice una mascara o un respirador cuando trabaje en áreas sospechosas. Esparcir el suelo con una solución de formaldehído ayuda a matar el hongo.

Aunque esta enfermedad esta asociada con las aves, no es una enfermedad zoonotica, porque le reservorio es el suelo y no las aves. Esto es, sin embargo, una pequeña consecuencia de los infortunados que son infectados.

En Florida, la histoplasmosis es reportada como enfermedad zoonotica para los animales y la salud. Si se sospecha que una persona esta contaminada con histoplasmosis, debe notificarse a la oficina publica del condado en 48 horas.

2.5.8 Criptococosis

Otro hongo que prefiere crecer en los suelos enriquecidos con heces de pollo es *Cryptococcus neoformans*. El periodo de incubación es de semanas. Las infecciones se presentan en muchos mamíferos, pero ocurre mas frecuentemente en humanos, caballos, perros, y gatos. La infección es rara en aves.

La transmisión de criptococosis es usualmente por inhalación de levaduras parecidas a los hongos, aunque puede ocurrir ocasionalmente por ingestión. Los humanos pueden recoger esta enfermedad de los nidos de las palomas.

En humanos, se manifiesta como meningitis o meningoencefalitis, y es usualmente precedida por una infección pulmonar con tos, estornudo con sangre, fiebre y malestar. El curso de esta enfermedad es usualmente crónico. Se presenta fiebre, tos, dolor de pecho, y escupen sangre del tracto respiratorio, seguido por dolor de cabeza, cuello rígido y molestias visuales. Como en la histoplasmosis, esta enfermedad esta asociada a la aves, pero no es una enfermedad zoonotica porque el reservorio es el suelo y no las aves. En Florida, criptococosis no es una enfermedad reportable.

2..5.9 Criptosporidiosis

Esta enfermedad es causada por un protozooario del genero *Cryptosporidium*. Existen tres especies conocidas, *C. baileyi*, *C. meleagridis* y una especie sin nombre en codorniz. Esta enfermedad normalmente causa problemas respiratorios en pollos y pavos. Puede causar también gastroenteritis y diarrea. En humanos causa dolor abdominal, nausea, y diarrea acuosa durante 3-4 días. En individuos con problemas de inmunidad, puede causar severo daño, diarrea persistente con mala absorción de nutrientes y perdida de peso. El periodo de incubación es de 3-7 días, y es esparcido por la vía fecal-oral por ingestión de oocitos infectados. En Florida, la cryptosporidiosis es reportada como enfermedad. Si se sospecha que una persona esta contaminada, debe notificarse a la oficina publica del condado en 48 horas.

2.5.10 Alveolitis Alérgica

La alveolitis alérgica también es conocida como enfermedad del pulmón de la paloma, es una de las enfermedades zoonoticas más importantes. Puede presentarse en fase aguda, subaguda y crónica. Los signo clínicos son causados por una capacidad pulmonar reducida debido a una reacción de hipersensibilidad de las plumas, o pequeñas partículas de plumas, o polvo fecal. La inflamación de las unidades de intercambio de aire pulmonar (alvéolos) es la lesión provocada.

La forma aguda de la enfermedad es usualmente precipitado por atosigada exposición de un individuo, como cuando limpia una caseta de palomas. Los síntomas se presentan en un periodo corto, en incluyen tos, dificultad para respirar, fiebre, y escalofríos. Si la exposición cesa en este punto, los síntomas

se resuelven y no hay necesidad de tratamiento. Crónica, una exposición más ligera es más seria, y los síntomas se pueden confundir con un resfriado. Los individuos afectados tienen una tos crónica, intolerancia al ejercicio, y pérdida de peso. Lesiones permanentes en el pulmón pueden desarrollarse, incluyendo fibrosis pulmonar que reduce el intercambio gaseoso y la capacidad pulmonar. La alveolitis alérgica crónica puede desarrollarse tan rápido como en dos años, pero usualmente toma de 10-20 años. Pacientes diagnosticados con esta forma crónica no tienen más opción que dejar de convivir con las aves. La exposición de tan solo minutos a las plumas, o heces puede ocasionar la recurrencia de problemas respiratorios. La severidad de la enfermedad puede ser disminuida utilizando una máscara mientras limpian las jaulas, bañan las aves mascotas, e instalando sistemas de purificación del aire.

2.6 Probióticos en Aves de Engorda

Por años, las industrias y los laboratorios de investigación han buscado las aplicaciones de los organismos probióticos en animales. El uso de los probióticos como alternativa natural para mejorar el funcionamiento del metabolismo animal; ha demostrado resultados muy interesantes. Modernas granjas utilizan dietas alimenticias (a base probióticos) que disminuyen el estrés, aumentan la microflora intestinal, lo que conlleva al animal a aumentar su resistencia a las infecciones (sistema inmunológico). Mejorar la salud animal, rendimiento en peso y funcionamiento metabólico, ha sido siempre la meta para los productores de ganado de carne y leche.

El mercado de los productos probióticos podría verse pronto ampliado a filetes, muslos o pechugas de pollo. De acuerdo con los resultados de investigaciones publicados recientemente, la incorporación de bacterias *benéficas* a la dieta de aves de corral produce como resultado aves «más sanas y seguras» para comer. Los resultados se han publicado en *Letters in Applied Microbiology*.

Los denominados productos probióticos parecen ganar crédito a medida que se comprueban los efectos que determinadas bacterias, en especial de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, producen sobre el organismo humano y, como se está viendo ahora, también en el de animales de granja destinados

a consumo humano. Los beneficios que se les atribuyen van ya más allá de su contribución a la regulación de procesos digestivos. La posibilidad de competir con microorganismos patógenos y limitar el uso excesivo de antibióticos, confieren unas posibilidades de aplicación superiores a las previstas inicialmente. Los beneficios, aunque todavía de forma experimental, han sido verificados ahora en pollos.

Arjan Narbad, investigador del Institute of Food Research, de Noruega, destaca en el trabajo publicado recientemente las constataciones, a su entender sólidas, acerca de los beneficios que *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* producen en el tracto digestivo humano, ampliamente documentados a partir de la ingesta de yogures y otros productos lácteos de fermentación en los que la presencia de bacterias (añadidas o no) se traduce en mejoras de mecanismos fisiológicos de la digestión. La tesis de Narbad es que estos beneficios no son exclusivo de los humanos.

2.6.1. Dieta probiótica para pollos

La alimentación probiótica en aves de corral redonda en animales más sanos y seguros y con mayor tasa de crecimiento. La alimentación probiótica en aves de corral, señala Narbad en el artículo publicado, no se traduce únicamente en que los pollos, al menos aparentemente, «crecen más sanos». También son «más seguros». ¿A qué se debe el incremento de seguridad? «A la capacidad de la flora bacteriana para competir por los mismos recursos con microorganismos patógenos», responde el investigador.

La competencia que se establece entre distintos grupos de microorganismos ha sido verificada por el equipo de investigación noruego en ensayos *in vitro* y posteriormente *in vivo*. Los protagonistas del estudio son *Lactobacillus johnsonii* en el papel de «bacteria buena» y *Clostridium perfringens* y *Campylobacter* en el de «malos». En ambos casos, asegura Narbad, se obtienen resultados positivos de la competencia establecida.

En experimentos realizados en laboratorio, los investigadores comprobaron como *C. perfringens* y *Lactobacillus* compiten literalmente por los mismos

recursos alimenticios, de modo que el segundo acababa imponiéndose sobre el primero. Como resultado, las colonias bacterianas benéficas reducían el número de las patógenas hasta casi su extinción por la imposibilidad de hacerse con el alimento.

Trasladada la experiencia a animales vivos, comprobaron como una única dosis de alimento con bacterias del género *Lactobacillus* era suficiente para acabar con los síntomas ocasionados por la presencia de clostridios, visibles en aves de corral por su apariencia enfermiza un menor peso de lo normal.

La experiencia se repitió con *Campylobacter*. Aunque los resultados obtenidos no fueron del mismo calibre, se observó igualmente una respuesta positiva a alimentación con probióticos.

Las conclusiones de los investigadores son tan claras como obvias. Una mejor alimentación animal redundará en su salud general y, por consiguiente, en la obtención de productos para consumo mucho mejores tanto en lo que respecta a su calidad como a su seguridad. Si esta alimentación se basa en una dieta con suplementos probióticos, concluyen, puede limitarse de forma efectiva la presencia de patógenos «a un coste razonable» ya que, como valor añadido, se puede reducir la carga de antibióticos suministrada a los animales.

2.6. 2 Probióticos y Patógenos

La influencia positiva de los alimentos probióticos en la dieta diaria está ampliamente documentada, en especial para aquellos productos lácteos obtenidos a partir de procesos de fermentación como los yogures. La llegada reciente al mercado de este tipo de alimentos, de los que tradicionalmente se sospechaba su efecto beneficioso, pero sobre los que hasta hace pocos años no se han conocido sus bases científicas, se ha traducido en una auténtica moda en forma de yogures con bifidos activos o flora bacteriana que contribuye a mejorar mecanismos digestivos.

Los estudios de los investigadores noruegos añaden ahora la perspectiva de una mayor seguridad en su consumo y llaman la atención sobre sus efectos en aves de corral. En diversos experimentos recogidos por la revista *Nature* se

comprueba cómo aumenta igualmente su tasa de crecimiento, lo cual abre las puertas a explorar nuevas vías de productividad.

En cualquier caso, tanto los científicos que describen animales aparentemente libres de patógenos gracias al uso de probióticos en su dieta como los que señalan una mayor productividad, advierten de que es necesario continuar manteniendo precauciones básicas para su consumo.

En este sentido, recuerdan que una parte nada despreciable de infecciones causadas por clostridios se producen por el consumo de carne de pollo poco o mal cocinada y que lo mismo ocurre con *Campylobacter* cuando no se observan las adecuadas condiciones de conservación y cocinado. De ahí que mantener la cadena de frío, observar los tiempos de conservación recomendados y usar una adecuada relación tiempo-temperatura continúen siendo las mejores medidas preventivas.

2.6.3 Efectos beneficiosos del uso de los *Bacillus* y sus endosporas como Probióticos en aves.

Según Ross Tech (1999) las esporas de *Bacillus* unidas a otras especies de bacterias tales como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*, contribuyen a disminuir la acidez del intestino, favoreciendo los procesos digestivos y el control del crecimiento de Enterobacteriaceae en aves.

Dentro de la actividad enzimática específica de algunas especies de *Bacillus* se citan:

Se produce proteasa, amilasa, β -glucanasa y otras enzimas por *Bacillus subtilis*, produce proteasa, amilasa y otras enzimas el *Bacillus licheniformis* y produce β -9 glucanasa la especie de *Bacillus circulans*.

El empleo de endosporas de *Bacillus sp* puede contribuir a una disminución de acidez del intestino en las aves, favoreciendo el crecimiento de *Lactobacillus* en el TGI, estimulando el sistema inmune, contribuyendo a la resistencia contra el desafío de patógenos ambientales, Inhibiendo y controlando el crecimiento microbiano de bacterias dañinas y favorecen los procesos digestivos del (Anon, 1998). Las endosporas de *Bacillus subtilis* que generalmente, permanecen

viables en el alimento suministrado a aves son estables en la acidez gástrica, actúan contra patógenos específicos en el intestino e incrementan los *Lactobacillus* del tubo intestinal (Jiraphocakul et al, 1990).

2.7 Encapsulado de Microorganismos Probióticos

La microencapsulación protege a los materiales encapsulados de factores como el calor y la humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad, también se ha utilizado para mejorar el sabor y la estabilidad de medicamentos y como barrera contra malos olores y sabores. Ayuda, además, a que los materiales frágiles resistan las condiciones de procesamiento y empaque mejorando sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia. En el caso de fármacos cuya liberación se lleve a cabo en el estómago o en el intestino, permite una máxima absorción de los compuestos con un mínimo de reacciones adversas. Además la microencapsulación protege a los probióticos de los bacteriófagos y de los ambientes adversos, como la congelación y las soluciones gástricas, y facilita la manufacturación de productos fermentados, ya que, proporciona unas condiciones más constantes.

La selección del método de encapsulación estará en función del tamaño medio de la partícula requerida, de las propiedades físicas del agente encapsulante, de la sustancia a encapsular, de las aplicaciones del material encapsulado propuesto, del mecanismo de liberación deseado y del coste.

2.7.1 Métodos de Encapsulación

Diversos métodos han sido propuestos para la producción de microcápsulas. En general, estos métodos pueden ser divididos en tres grupos:

- (1) Procesos físicos: secado por aspersion, extrusión y recubrimiento por aspersion.
- (2) Procesos fisicoquímicos: coacervación simple o compleja y atrapamiento en liposomas.
- (3) Procesos químicos: polimerización interfacial e inclusión molecular.

La selección del proceso de encapsulación para una aplicación considera el tamaño medio de la partícula requerida y las propiedades fisicoquímicas del agente

2.7.1.1 Secado por aspersión

El secado por aspersión es ampliamente usado en la industria de los alimentos debido a que es un método económico y efectivo en la protección de materiales, en particular empleado en la deshidratación de leche⁴. Los almidones modificados, las maltodextrinas y las gomas son empleados como acarreadores o materiales pared. El material a encapsular es homogenizado con el acarreador; la mezcla es alimentada al secador por aspersión y se atomiza por medio de una boquilla o disco; las cápsulas son colectadas posteriormente. Desarrollos recientes se han hecho con nuevos acarreadores, incluyendo coloides y gomas naturales, para la obtención de mezclas que permitan incrementar la retención de compuestos volátiles y la vida de anaquel de las microcápsulas. Se ha conseguido la retención de aceites esenciales de naranja y disminuido su oxidación al usar goma arábica

2.7.1.2 Aspersión por enfriamiento o congelamiento

Una variante del secado por aspersión consiste en enfriamiento o congelamiento, donde el material a encapsular es mezclado con el acarreador y es atomizado por medio de aire frío. Las microcápsulas son producidas por nebulización de la emulsión o suspensión que contiene el material pared y la sustancia activa sólida o líquida. Las coberturas empleadas usualmente son aceites vegetales en el caso de aspersión por enfriamiento o aceite vegetal hidrogenado para la aspersión por congelamiento; así pueden encapsularse líquidos sensibles al calor y materiales que no son solubles en disolventes convencionales. La reducción de la temperatura produce una solidificación del lípido pared y el atrapamiento de la sustancia activa en el centro de la cápsula. La aspersión por enfriamiento es usualmente empleada para encapsular sulfato ferroso, vitaminas, minerales o acidulantes. Las aplicaciones más comunes de la aspersión por congelamiento incluye el secado de sopas y los alimentos con altos contenidos de grasa. Las microcápsulas producidas por enfriamiento o congelamiento son insolubles en agua debido a su cobertura de lípidos por lo que se encapsulan materiales solubles como enzimas, vitaminas solubles en agua y acidulantes.

2.7.1.3 Extrusión

La microencapsulación por extrusión involucra el paso de una emulsión del material activo y el material pared a través de un dado a alta presión. La extrusión constituye el segundo proceso más usado, después del secado por aspersión, para la encapsulación de sabores. Un proceso típico involucra la mezcla de sabores con jarabe de maíz o almidón modificado caliente, extruyendo la mezcla en forma de esferitas (*pellets*) dentro de un baño con un disolvente frío como el isopropanol. El disolvente frío solidifica el jarabe en un sólido amorfo, bañando los sabores. Los sabores extrudidos proporcionan una mayor vida de almacenamiento comparados con los que no son encapsulados. La vitamina C y los colorantes pueden tener una vida de almacenamiento superior a dos años. Además, la forma sólida de los sabores es más conveniente para su uso. La aplicación de este método en el procesamiento de alimentos incluye bebidas, pasteles, gelatinas, postres, así como numerosos sabores.

2.7.1.4 Cobertura por lecho fluidizado

Esta técnica consiste en suspender partículas sólidas en aire a alta velocidad dentro de una cámara con temperatura y humedad controlada, donde el material pared es atomizado⁷. La cantidad de partículas cubiertas depende de la longitud de la cámara y del tiempo de residencia dentro de ésta. La técnica es aplicable a coberturas que funden fácilmente (como aceites vegetales hidrogenados, estearinas, ácidos grasos, emulsificantes, ceras) o coberturas solubles (como almidones, gomas y maltodextrinas). Para coberturas fundibles se usa aire frío para endurecer el acarreador, mientras que para las coberturas solubles se usa aire caliente para evaporar el disolvente. Los ingredientes con facilidad de fundir son liberados al incrementar la temperatura o por ruptura física, mientras que las coberturas solubles liberan su contenido al adicionar agua. Alimentos fortificados y mezclas nutricionales contienen ingredientes encapsulados por lecho fluidizado; algunos ejemplos son: ácidos cítrico, láctico y sórbico; bicarbonato de sodio utilizado en productos de panificación.

2.7.1.5 Atrapamiento en liposomas

Un tipo de cápsula con más propiedades versátiles y menos fragilidad que aquellas hechas de grasa es el de los liposomas. Estos han sido empleados para la liberación de vacunas, enzimas y vitaminas en el cuerpo^{8,9}, y consisten de una o más capas de lípidos no tóxicos y aceptables en alimentos; la permeabilidad, estabilidad, actividad superficial y afinidad pueden variar con el tamaño y la composición del lípido. Los liposomas son vesículas que se forman cuando películas de fosfolípidos son dispersadas en un medio acuoso; al igual que las membranas naturales, los liposomas son selectivamente permeables a iones; los liposomas se forman cuando una solución acuosa de sustancia activa es mezclada con la película del lípido. Estructuralmente existen tres tipos de liposomas: multilamelar, vesículas de un compartimiento y macrovesículas. La sonicación permite la formación de un solo compartimiento de vesículas, mientras que las macrovesículas son formadas por inyección de soluciones de lípido en un *buffer* de fosfatos. Los liposomas pueden ser obtenidos con cargas positivas por la adición de aminos o con cargas negativas por la adición de fosfatidil serina o diacetil fosfato. Materiales hidrofílicos e hidrofóbicos pueden ser atrapados en liposomas; los compuestos hidrofílicos son disueltos en agua y mezclados con una película lipídica para formar liposomas, mientras que los materiales hidrofóbicos son embebidos en una delgada película de lípido. La liberación del principio activo se realiza por difusión a través de la bicapa, por destrucción de la vesícula, por medio de una concentración crítica de iones calcio o por un cambio de pH. El colesterol y los tocoferoles pueden ser incorporados para reducir la permeabilidad de la membrana e incrementar la estabilidad de los lípidos en la bicapa. Las sustancias activas solubles en agua presentan una mejor eficiencia de encapsulamiento que las hidrófobas; los liposomas son usados con éxito en la encapsulación de sistemas enzimáticos; sin embargo, el uso de disolventes orgánicos limita su uso en aplicaciones en alimentos.

2.7.1.6 Inclusión de complejos

La inclusión de complejos, también conocida como encapsulación molecular, utiliza β -ciclodextrinas para el atrapamiento de moléculas. Estas ciclodextrinas (CD) tienen un centro hidrofóbico mientras que la superficie exterior es

hidrofílica. Las CD forman complejos por inclusión o por huésped-anfitrión. El principal mecanismo de las CD involucra la formación de complejos por inclusión de analitos: permiten un equilibrio dinámico en el cual agua u otro compuesto, son reemplazados en la cavidad de la molécula de CD10. La estabilidad de estos complejos depende de la estructura, hidrofobicidad de la molécula, pH, disolvente orgánico, temperatura y concentración de la CD. La preparación de complejos se realiza por dos métodos: en el primero la molécula huésped y la CD son cristalizadas, un disolvente menos hidrofóbico que la molécula huésped se mezcla con los componentes dando una acomplejación de la molécula huésped hacia el centro de la ciclodextrina, la ciclodextrina y la molécula huésped son mezcladas en agua durante un tiempo hasta conseguir el equilibrio. El segundo método involucra la forma gaseosa de la molécula huésped en una solución de CD. Los complejos de inclusión obtenidos son sólidos cristalinos y pueden adicionarse a alimentos secos con un mínimo de degradación o pérdida del compuesto huésped durante el almacenamiento. Las CD protegen sabores y otros ingredientes sensibles al calor que son adicionados en alimentos extrudidos. Aceite de ajo, cebolla y vitaminas A, E y K son acomplejados por CD.

III. METODOLOGIA

El desarrollo de este proyecto se realizó en el Centro de Microbiología Aplicada (CEMAP) Laboratorio de la Empresa Mexicana GBS Global S.A. de C.V., ubicado en la Col. Latinoamericana Saltillo, Coahuila.

3.1 Activación de Microorganismos Probióticos

En este estudio se sometieron 19 cepas probióticas, para evaluar su efecto benéfico y viabilidad. Las cepas fueron propagadas y sembradas en agar MRS en cultivo sólido, para posteriormente realizar estudios en medio MRS en cultivo líquido. Para el siguiente paso las cepas fueron purificadas para evitar la contaminación.

3.2 Adaptación de jarras de anaerobiosis

Se emplearon reactores anaeróbicos de capacidades de 250 ml para fermentaciones en medio líquido y de 4 L para fermentaciones en medio de cultivo sólido, introduciendo las cajas Petri sembradas (Figura 1).

A las tapas de los reactores utilizados se les realizó 2 perforaciones y se colocaron tapones de plástico, sellándolos y pegándolos con Silicon. Para lograr un estado anaerobio se inyectó nitrógeno para remplazar el oxígeno, por medio de agujas, el tiempo se estableció según el tamaño del reactor.

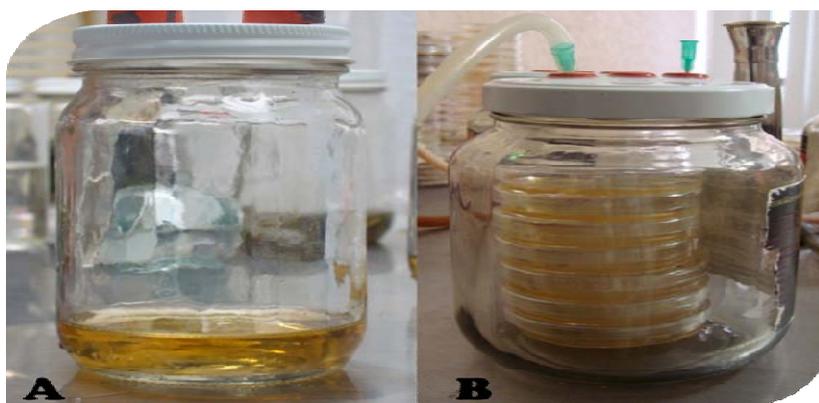


Figura 1A: Frasco con medio de cultivo líquido. Figura 1B: Frasco con medio sólido.

3.3 Preparación de medios de cultivo

El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas.

3.3.1 Medio de cultivo líquido. Caldo MRS

Cuadro 1. Composición química

Formula (gramos por litro)	
Proteasa peptona	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Glucosa	20
Tween 80	1 ml
Citrato de amonio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotasico	2

3.3.1.1 Forma de preparación

Se disolvieron todos los reactivos en 1 L de agua destilada, se agregó 1 ml de Tween, después se agregaron 25 ml del caldo en cada reactor y se colocó la tapa. Por último se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos, se taparon perfectamente los frascos y se dejó enfriar.

3.3.2 Medio Agar MRS

Cuadro 2. Composición química

Formula (gramos por litro)	
Proteasa peptona	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Glucosa	20
Tween 80	1 ml
Citrato de amonio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotásico	2
Agar	13

3.3.2.1. Forma de Preparación

Se disuelven todos los reactivos en 1 L de agua destilada, se agrega un 1 ml de Tween se esteriliza a 121° C por 15 minutos, se deja enfriar un poco para después realizar el llenado de cajas.

ETAPA 1: PURIFICACION E IDENTIFICACION DE LAS CEPAS

3.4 Identificación e Inoculación de las Cepas Probioticas

En total las 19 cepas se inocularon en 25 ml de caldo MRS en reactores de 250 ml, tomando una asada de colonias puras, se mezclo y en el reactor se inyectó nitrógeno para quitar el sobrante de oxigeno, y se incubaron a 37° C por 24 horas.

Al día siguiente se realizo la siembra en placas de Agar MRS en campana de flujo, se colocaron las cajas en el reactor de 4 L y se inyecto el nitrógeno para crear la atmosfera de anaerobiosis para después se incubaron a 37° C por 24 horas.

Se realizó tinción de Gram. a cada una de las cepas, se observó en el microscopio óptico para poder identificar de acuerdo a su morfología. Para lo cual se realizó la siguiente técnica.

3.4.1 Fijar un frotis

- 1.- Se fija un frotis, colocando una gota de agua con el asa bacteriológica en el portaobjetos.
- 2.- Flamear el asa bacteriológica en un mechero, esperar a que enfríe un poco para así poder tomar un poco de muestra.
- 3.- Ya tomada la muestra se coloca en el portaobjetos, previamente con agua, extendiendo la muestra en movimientos circulares.
- 4.- Esperar a que seque para poder fijar la muestra.

3.4.2 Tinción de Gram

Esta técnica permite observar en microscopio óptico las características de los microorganismos gracias a los colorantes que se utilizan.

Cristal violeta: se le agrega una gota, logrando que se cubra toda la muestra y se deja actuar por 1 minuto, transcurrido el tiempo se enjuaga.

Lugol: se agrega una gota sobre toda la muestra, dejando actuar por 1 minuto, transcurrido el tiempo se enjuaga.

Alcohol Cetona: se agrega una pequeña gota en la muestra, dejando actuar muy poco tiempo, enjuagar de inmediato.

Safranina: por último se agrega una gota en la muestra. Dejando actuar por 1 minuto, transcurrido el tiempo se enjuaga.

Se dejan secar. Observar en el Microscopio.

3.5 Purificación de las Cepas

Ya que las cepas fueron chequeadas e identificadas microscópicamente se purificaron por medio de la técnica de estría por agotamiento en placas de agar MRS realizando tinción de Gram. Para comprobar su pureza. Las que resultaron puras se sometieron a congelación en viales para su conservación.

3.5.1 Resiembra

Para este paso se necesito limpiar perfectamente el área donde se trabajo, en total esterilidad. Con un asa bacteriológica previamente mechada, se tomo una pequeña muestra de las colonias puras. Esta misma muestra se sembró en placas de agar MRS limpio, se extendió por toda la caja por agotamiento.

Se tapan y se sellan perfectamente con plástico transparente. La caja o cajas se colocaron en reactores de 4 Lts al cual se le inyecto Nitrógeno por 8 minutos. Se dejaron incubando de 18 a 24 horas.

ETAPA 2: CONSERVACION DE CEPAS PROBIOTICAS.

3.6 Congelación

La siguiente etapa de esta investigación consistió en conservar las cepas libres de toda contaminación, para lo cual, se utilizo el cultivo de microorganismos probióticos conservados en caldo MRS e incubados a 37° C en anaerobiosis.

En viales perfectamente estéril se coloco 500 µL de cultivo de la cepa probiotica y 500 µL de leche preparada (90 ml de leche descremada con 10 ml de glicerol).

Se identificaron los viales con los nombres de cada cepa probiotica se colocaron en bolsas de plástico y se conservaron en congelación.

ETAPA 3. SELECCIÓN DE LAS CEPAS

3.7 Preparación de inculo para bacterias patógenas

En frascos de 275 ml se coloco 50 ml de Caldo Nutritivo, se esterilizo en autoclave a 121° C por 15 minutos, se dejo enfriar, posteriormente se inculo con 1 ml de las siguientes bacterias: *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus*, *S. typhi*. Se incubaron a 37°C de 18 a 24 horas.

3.7.1 Aislamiento de la bacteria de *Salmonella* en Pollos de granja

En 25 ml de agua peptonada se disolvió 5 gr de heces fecales de pollo, se agito con fuerza y se dejo en reposo.

Para lograr el aislamiento de *Salmonella* se realizaron diluciones seriadas de la 10^{-1} a la 10^{-6} , a partir de heces fecales de pollo.

3.7.1.1. Agar *Salmonella-Shigela*

Cuadro 3. Composición química del agar *Salmonella-Shigela*

Componente	gr/L
Pluripeptona	5
Extracto de carne	5
Lactosa	10
Mezcla de sales biliares	8.5
Citrato de sodio	8.5
Tiosulfato de sodio	8.5
Citrato ferrico	1
Agar	13.5
Verde brillante	0.00033
Rojo neutro	0.025

3.7.1.2 Preparación

Se preparo Agar selectivo *Salmonella-Shigela* el cual se calentó, para mejor dilución y solidificación, se dejo enfriar para poder hacer el llenado de placas.

3.7.1.3 Siembra

Posteriormente se sembró utilizando una varilla de vidrio, de cada una de las diluciones seriadas, se sellaron perfectamente y se encubaron a 28° C de 18 a 24 horas. Se realizaron las observaciones correspondientes. Se inoculo en 50 ml de Caldo Nutritivo.

3.7.2 Obtención de Biomasa de Microorganismos Probióticos

Para realizar este proceso se centrifugo a 4500 revoluciones por 30 minutos, colocando 45 ml de concentrado de las cepas probióticos en caldo MRS en tubos ependolf, los cuales fueron pesados, antes de centrifugar.

Fueron identificados con su nombre y se sometieron a congelación para su buena conservación

3.7.3 Prueba contra bacterias Patógenas

Las 5 bacterias patógenas para esta prueba fueron conservadas en Caldo Nutritivo en refrigeración.

Cuadro 4 Composición química del Agar Nutritivo

Componente	gr/L
Pluripeptona	5
Extracto de carne	3
Cloruro de sodio	8
Agar	15

3.7.3.1 Siembra de bacterias patógenas.

Se realizaron placas de agar MRS se sembró cada bacteria patógena extendiendo con una varilla de vidrio, después se colocaron con unas pinzas previamente mechadas papel filtro estéril (4 papelitos), remojado en biomasa de la cepa probiotica. Fueron perfectamente selladas y encubadas a 28° C por 24 horas. Al día siguiente se checan las cajas midiendo el diámetro y tomando foto. Así se realizo esta prueba con las 19 cepas probioticas para evaluar la inhibición con cada una de las 5 bacterias patógenas, se realizaron 3 repeticiones para obtener un promedio más exacto.



Figura 2: Ejemplo placa de agar sembrada con papel filtro

ETAPA IV: ENCAPSULADO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS

3.8 Microencapsulación

La microencapsulación protege a los materiales encapsulados de factores como el calor y la humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad, también se ha utilizado para mejorar el sabor y la estabilidad de medicamentos y como barrera contra malos olores y sabores. Ayuda, además, a que los materiales frágiles resistan las condiciones de procesamiento y empaque mejorando sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia.

Diversos métodos han sido propuestos para la microencapsulación y producción de microcápsulas. La selección del proceso para una aplicación considera el tamaño de la partícula requerida, las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante, la sustancia a encapsular, y el mecanismo de liberación deseado, así como los costos asociados a todo el proceso.

3.8.1 Cepas seleccionadas

Las cepas seleccionadas para encapsular fueron las identificadas como: Alfalfa, Calabaza y Suero. Estas cepas se cultivaron en 50 ml Caldo MRS estéril por 24 horas a 37° C en reactores de anaerobiosis.

3.8.2 Procedimiento de Encapsulado

3.8.2.1 Preparación de material estéril

En vasos de precipitado de 250 ml se prepararon 200 ml de agua destilada con 5 gr. de alginato, se diluye perfectamente ya que se forman brumos, esta solución nos permite la formación de las capsulas junto con el cloruro de calcio, ya que esta listo se esteriliza a 121° C por 15 minutos en autoclave añadiendo un magneto. Se deja enfriar y se conserva.

En matraz de 500 ml y 1000 ml se preparo 1000 ml de agua destilada con 20 gr de cloruro de calcio, esta solución nos permite que se formen las capsulas, se disuelve perfectamente y se esteriliza a 121° C por 15 minutos. Se deja enfriar y se conserva.

En matraz de 500 ml y 1000 ml se preparo 1000 ml de agua destilada con 8.5 gr de solución salina, esta solución funciona como enjuague para las capsulas, se disuelve y se esteriliza a 121° C por 15 minutos. Se deja enfriar y se reserva.

3.8.3 Procedimiento de Encapsulado

Para comenzar esta etapa se adiciono los 50 ml de suspensión bacteriana seleccionada al de alginato estéril, se disolvieron perfectamente. Se tomo la jeringa se lleno con 10 ml de la mezcla, se ejerce presión dejando caer gota por gota en una charola de aluminio, previamente esterilizada, conteniendo la solución de cloruro de calcio, para así lograr la formación de las capsulas. La charola de aluminio esta en constante movimiento para evitar que las capsulas se peguen entre ellas.

Cuadro 5 Composición química del Cloruro de Calcio

Componente	Gr/L
Cloruro de Calcio	93-100 %

Posteriormente se siguió con la fase de enjuague, esto se realizo con la solución salina utilizando un embudo en un matraz con papel filtro estéril se enjuga para quitar el exceso del cloruro de calcio.

Ya que se enjuagan las pequeñas capsulas se colocan en otro matraz con caldo nutritivo, y se dejan en agitación (shaker) por 24 horas.

El secado puede llevar de 24 a 48 horas dependiendo. Las capsulas se colocaron en charolas de aluminio esterilizadas con papel filtro también estéril lo cual el secado fue de 24 horas. Se despegan del papel y se colocaron en un tubo de ensaye.

3.8.3.4 Esquema del Procedimiento de Encapsulado

Las siguientes imágenes tratan de explicar de forma esquemática el proceso de encapsulado paso por paso.



V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Las 19 cepas proporcionadas para esta investigación fueron, identificadas, purificadas en placas con Agar MRS y conservadas mediante los métodos de congelación y encapsuladas por el método de extrusión que involucra simplemente la preparación de una solución hidrocoloidal y caen en una solución de endurecimiento o refuerzo.

ETAPA 1: PURIFICACION E IDENTIFICACION DE LAS CEPAS

Las cepas fueron observadas en el microscopio tomando en cuenta su morfología y tinción de Gram. Presentando la siguiente morfología:

Cuadro 6. Identificación de cepas

CEPAS	TINCION	FORMA
02-1	Gram +	Circular
Maíz	Gram +	Bastones
Frijol	Gram +	Circular
Alfalfa	Gram +	Circular
Tabasco	Gram +	Bastones
Ciruela	Gram +	Bastones
Sotol s/f	Gram +	Circular
Sotol F	Gram +	Circular
Pozol	Gram +	Circular
Aguamiel	Gram +	Circular
Calabaza	Gram +	Bastones
Manzana	Gram +	Circular
M1	Gram +	Bastones
M2	Gram +	Circular
Jagüey	Gram +	Circular
SR	Gram +	Circular
Leche	Gram +	Bastones
Suero	Gram +	Bastones
Jocoque	Gram +	Bastones

Los resultados observados arrojaron que las 19 cepas son Gram.+, se denominan bacterias Gram + a aquellas bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram y características de su estructura celular. De las cuales 11 cepas son de forma circular teniendo morfología de Coccus y 8 cepas resultaron con forma de bastón teniendo forma de Bacilos.

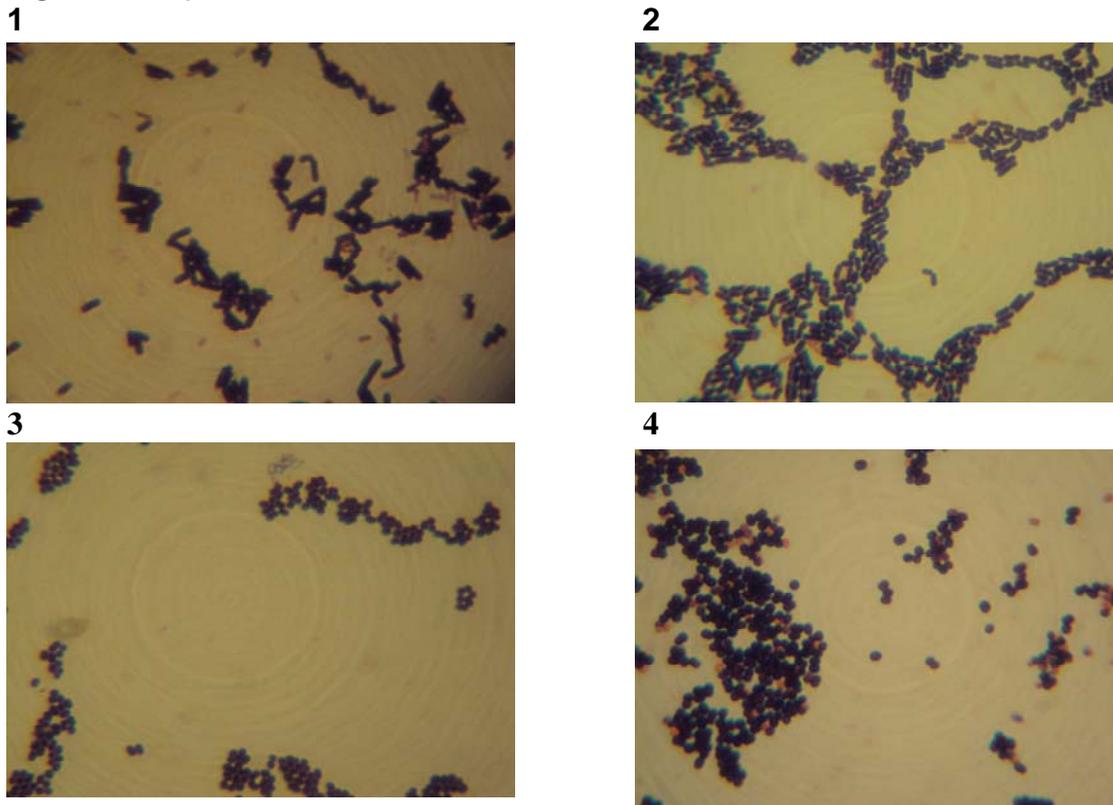
5.2 Purificación de Cepas

Las 19 cepas utilizadas en esta investigación presentaron contaminación, presentaron levaduras y diferentes colonias en una misma caja de Coccus y Bacilos por lo que se propuso sembrar en caja petri por la técnica de estriado por agotamiento. Realizando tinción de Gram. repetitivamente y observando morfología de las colonias en el microscopio se logro la purificación de las cepas.

5.2.1 Descripción de las cepas

En las siguientes fotografías se muestran los resultados de algunas cepas ya puras conservadas en caldo MRS. (Figura 3)

Figura 3. Cepas Puras



- 1.- Ceba nombrada Suero, presenta morfología de bacilos, tinción Gram.+
- 2.- Ceba nombrada Calabaza, presenta morfología de Bacilos, tinción Gram.+
- 3.- Ceba nombrada Alfalfa, presenta morfología de Coccus, tinción Gram. +
- 4.- Ceba nombrada 02-1, presenta morfología de Coccus, tinción de Gram. +

ETAPA 2: CONSERVACION DE CEPAS PROBIOTICAS.

Por medio de la congelación se lograra conservar la viabilidad y pureza de los microorganismos probióticos sin altera su estructura y metabolismo.

La congelación bacteriana es un método físico químico que permite conservar microorganismos viables por un tiempo sin sufrir cambios genotípicos. En este proceso se involucra el agua como microambiente y es ella la que cambia su estado de líquido a sólido; de otro lado, la bacteria inmersa en este medio debe adaptarse a las condiciones de este nuevo ambiente, transformar la velocidad de su metabolismo, conservar su viabilidad y evitar que los cristales de hielo formados por el cambio de temperatura del agua le ocasione algún daño.

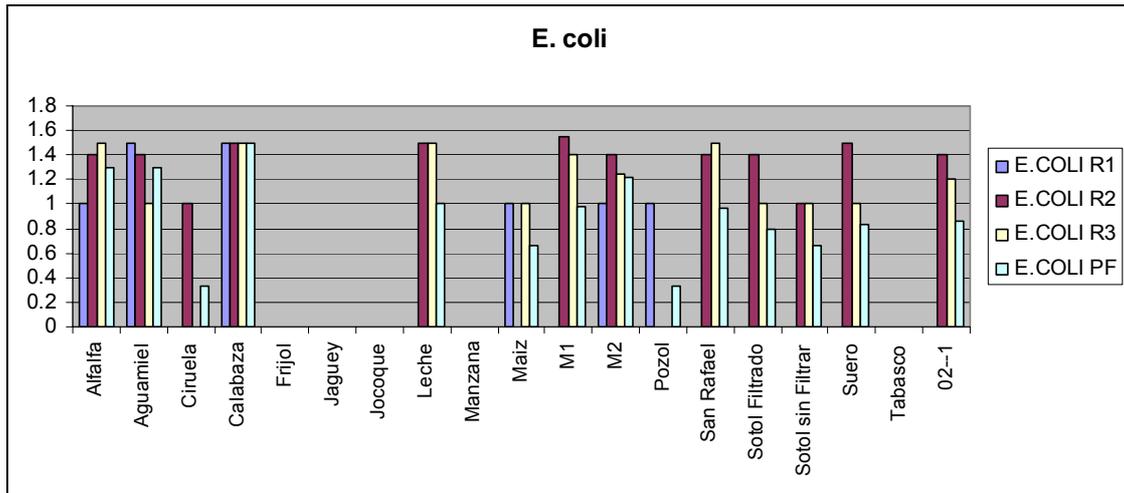
ETAPA 3. SELECCIÓN DE LAS CEPAS MÁS POTENTES

Para la selección de las cepas se realizaron 3 repeticiones para obtener un promedio más exacto para lo cual se analizaron los siguientes 3 parámetros:

- Inhibición en salmonella de pollo
- Mayor alo de inhibición
- Promedio de las 3 repeticiones

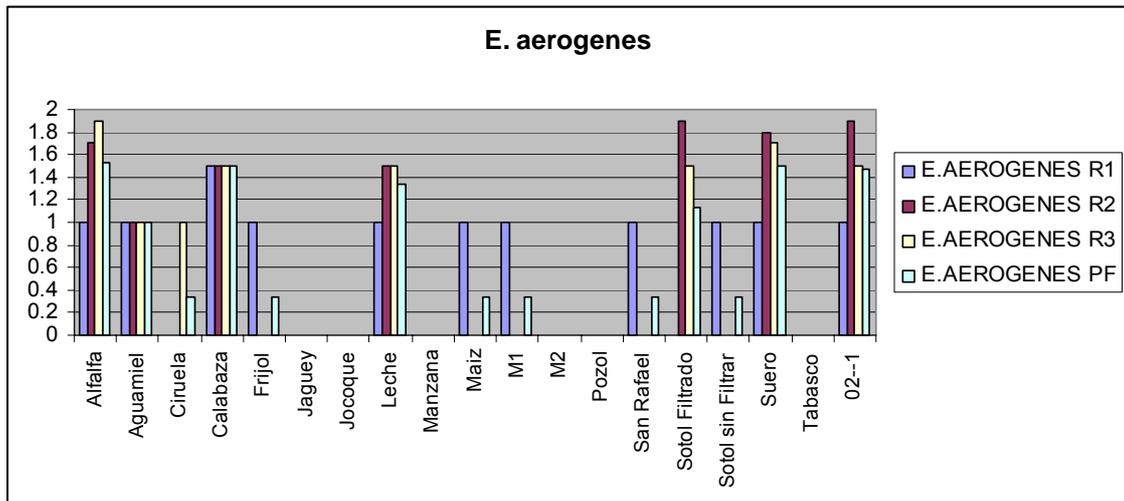
5.3 GRAFICAS DE COMPARACION

En las siguientes se muestran los resultados de las 19 cepas contra cada una de las 5 bacterias patógenas con sus tres repeticiones. A partir de estos datos se logro obtener un promedio final el cual se grafico de igual manera.



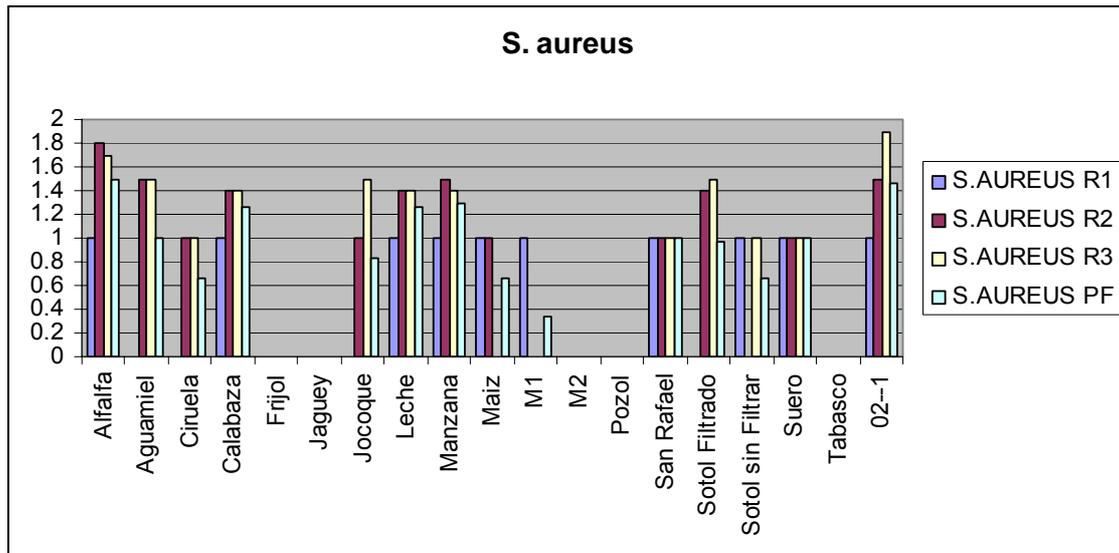
Grafica 1. E. coli con las 19 cepas probioticas.

En la grafica 1 se muestra que las cepas frijol, jaguey, jocoque, manzana y tabasco no tuvieron ninguna reacción en ninguna repetición de la prueba. Las de mediana reacción fueron leche, M1, M2, Suero, San Rafael. Las cepas con mayor reacción ante esta bacteria son Alfalfa, Aguamiel y Calabaza.



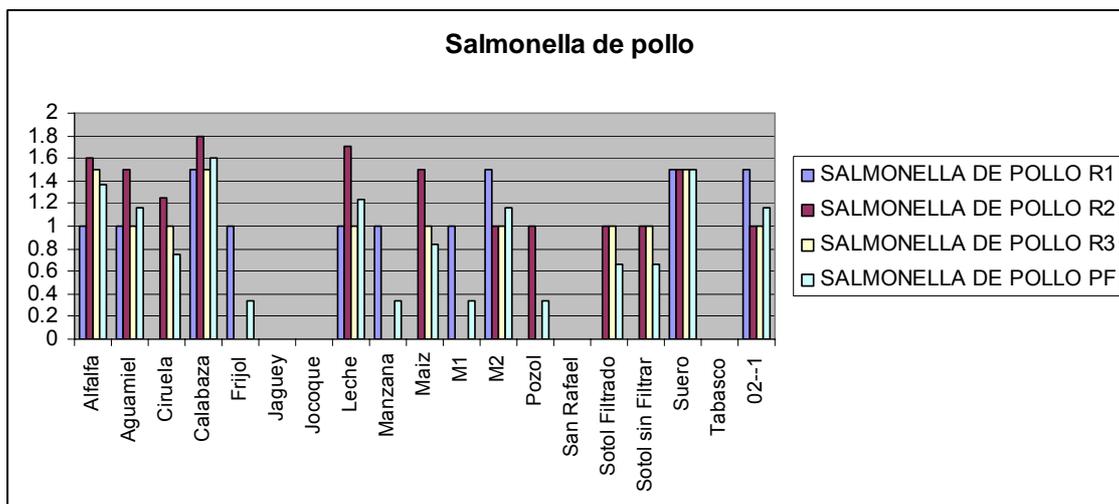
Grafica 2. E. aerogenes con las 19 cepas probioticas.

Las cepas Jaguey, Jocoque, M2, Pozol, y Tabasco no mostraron ninguna reacción contra esta bacteria. Con mediana reacción fueron Aguamiel, Leche, 02-1. Con mayor reacción fueron Alfalfa, Calabaza, Suero.



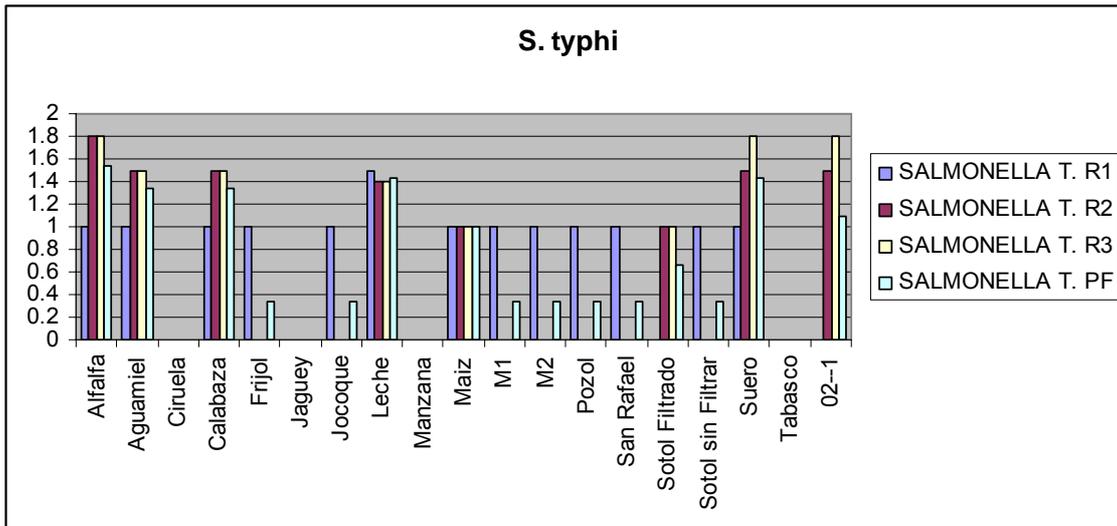
Grafica 3. S. aureus con las 19 cepas probioticas

Las cepas de mayor reacción fueron 02-1 y Alfalfa. Con mediana reacción teniendo promedio estándar fueron Aguamiel, Calabaza, Manzana, Leche y Sotol sin filtrar. Sin ninguna reacción se repitieron Frijol, Jaguey, Tabasco y M2.



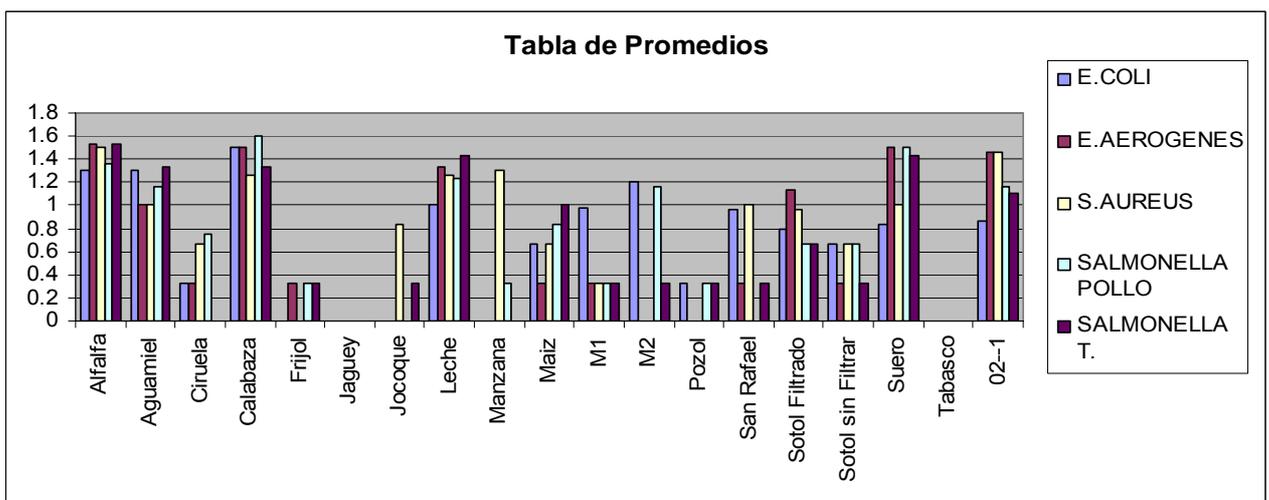
Grafica 4. Salmonella de pollo con las 19 cepas probioticas

Los resultados de esta grafica eran de interés ya que la inhibición contra esta bacteria era un factor importante para la selección de las cepas más fuertes. Las cepas con mayor reacción fueron Alfalfa, Calabaza y suero. Con mediana reacción fueron Aguamiel, Leche, M2 y 02-1. Sin ninguna reacción Jaguey, Jocoque, San Rafael y Tabasco.



Grafica 5. *S. typhi* con las 19 cepas probióticas

Las cepas que no tuvieron ninguna reacción fueron Ciruela, Jagüey, Manzana y Tabasco. De mediana reacción fueron Maíz, Sotol filtrado y 02-1. De mayor reacción fueron Alfalfa, Aguamiel, Calabaza, Suero y Leche.



Grafica 6. Promedio final

5.3.1 INTERPRETACION DE GRAFICAS

De las 19 cepas hay algunas que muestran mayor reacción contra bacterias patógenas como Alfalfa, Aguamiel, Calabaza, Suero, Leche la cuales también tienen el mismo comportamiento.

Las cepas de mediana reacción fueron las cepas Maíz, Sotol Filtrado y Leche.

Las cepas que no tuvieron ninguna reacción fueron Jagüey, Jocoque, Frijol y Tabasco en ninguna repetición.

Otro de los parámetros fue el mayor alo de inhibición. En las siguientes fotografías se muestran Alos de algunas bacterias contra las bacterias patógenas.

Figura 4. Cepa: Calabaza contra: Salmonella de pollo

Los Alos de inhibición de la cepa de calabaza fueron repetitivos en cada repetición, son grandes y muy definidos.



Figura 5. Cepa: Alfalfa Contra: E.Aerogenes

Los Alos de inhibición de la cepa Alfalfa repetitivos en cada repetición y definidos.

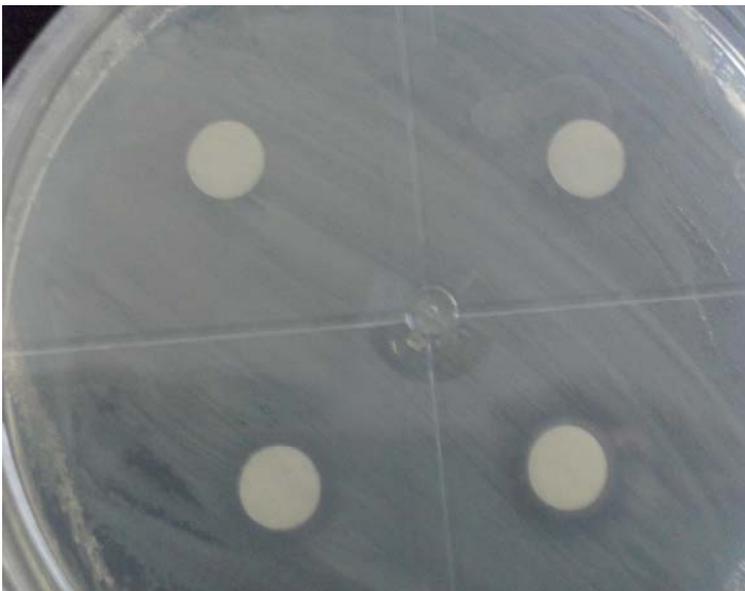


Figura 6. Cepa: Suero Contra: S. Aureus

Los Alos de inhibición de la cepa suero eran repetitivos en cada repetición muy marcados y definidos.



De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionaron las cepas probióticas: Alfalfa, Calabaza y Suero ya que presentaron un alo de inhibición marcado, repetitivo en las tres repeticiones, y lograron inhibición contra Salmonella de pollo.

ETAPA IV: ENCAPSULADO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS

Durante esta etapa se siguió preparando material y encapsulando, para tener reserva de material estéril.

Ya que las perlititas se someten al proceso de secado se pegan en el papel filtro para lo cual se desprenden con una varilla del papel, se colocaron en un tubo de ensayo y se pesó. Se logró obtener de 3 a 4 gr por 200 ml de alginato disuelto y 50 ml de suspensión de la cepa probiótica.

Las capsulas ya secas se pueden manipular ya sin esterilidad

Con una pequeña prueba que se realizó se comprobó la supervivencia de los microorganismos encapsulados, se colocó una capsula en placa de agar MRS y se incubó a 37° C por 24 horas. Al día siguiente se realizó y se obtuvo un buen crecimiento como resultado ya a la cual se le realizó tinción de gram y se encontraba la cepa pura.

CONCLUSIONES

Las 19 cepas pertenecientes a la colección de la empresa GBS Global S.A. de C.V. fueron identificadas morfológicamente obteniendo que once de ellas son cocos, las ocho cepas restantes bacilos todas estas cepas son Gram positivas principal característica de los microorganismos probióticos.

Se logro purificar y conservar las cepas probioticas mediante métodos diferentes de conservación, a corto plazo en placas, a mediano plazo congelación y a largo plazo encapsulación

Las cepas seleccionadas para esta investigación fueron Alfalfa, Calabaza y Suero ya que fueron las mejores cepas para encapsular por los resultados obtenidos contra bacterias patógenas y mayor alo de inhibición.

Bibliografía

Ligia Consuelo Sánchez Leal¹, Lucía Constanza Corrales Ramírez. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Edgar Mauricio Vargas, Clara Juliana Gómez, Mónica Eliana Parra, María Alexandra Romero, (2004), Producción de microorganismos probióticos como aditivo para alimentos concentrados para ganado vacuno (segunda parte) Revista de ingeniería # 20 facultad de ingeniería universidad de los andes noviembre.

Arturo F. Castellanos Ruelas, María de la Luz Murguía Olmedo, (1999), Evaluación de un probiótico para el control de *Salmonella* en pollos de engorda en Yucatán, Industrias Cuamex, S.A. de C.V., de México,

Grethel Milián Florido, Manuel Pérez Quintana, Yenisleidys Puentes, Martiatus y Ramón Bocourt Salabarría, Empleo de probióticos a base de *Bacillus sp* y sus endosporas en la producción avícola Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". Apartado Postal , Km 3 ½, Autopista Varadero, Matanzas. 2 Instituto de Ciencia Animal. Apartado Postal 24. San José de las Lajas, La Habana.

Juha Apajalahti y Anu Kettunen, Danisco Innovation, Enteromix Research, Sokeritehtaantie 20, FIN-02460, Kantvik, Finland, (Noviembre 2002), Efecto de la dieta sobre la flora microbiana en el tracto gastrointestinal de aves.

Arjan Narbad, Institute of Food Research, de Noruega
<http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2004/05/21/12465.php>

Por Enrique Moreno Ortega, Probioticos y Aves
<http://www.timbrado.com/artprobioticos.shtml>

Arturo Cortes Cuevas, Ernesto Avila, Silvia Carrillo Dominguez, María Teresa Casaubon, Septiembre 2000, El efecto de *Bacillus toyoi* sobre el comportamiento productivo sobre pollos de engorda. Centro de enseñanza, investigación y extensión en producción avícola, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Vasconcelos, J.A. 1998. Alimentos Funcionales. Conceptos y beneficios para la salud. World of food science. The World of Food Science. Encontrado Febrero 22, 2002. En la World Wide Web:
http://www.worldfoodscience.org/voll_3/featurel-3a.html

Departamento de Animal Science, del Servicio de Extensión Cooperativo de la Florida, del Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, universidad de la Florida. Publicado por primera vez en June 27, 2001.
<<http://edis.ifas.ufl.edu>>.

J.M. Gaskin, Profesor Asociado en Medicina Veterinaria-Patobiología, H.R.Wilson, Profesor, J.P. Jacob, Coordinador de Extensión de Avicultura; y F.B. Mather, Especialista en Extensión Avícola. Departamento de Ciencias en Avicultura y Producción de Leche,, Servicio de Extensión Cooperativo de Florida, Instituto de Ciencias en Alimentos y Agricultura, Universidad de Florida, Gainesville, 32611.
<http://edis.ifas.ufl.edu/an099>

Martín Villena MJ, Morales Hernández ME, Gallardo Lara V y Ruiz Martínez MA, 2009, Técnicas de Micro encapsulación: una propuesta para micro encapsular probióticos, Departamento de farmacia y tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada España.

Leonardo Colin Álvarez, Eduardo Morales Barrera, Ernesto Ávila González, 1994, Evaluación de promotores del crecimiento para pollos de engorda, Instituto Nacional de Investigación Forestales y Agropecuarias. Campo experimental Valla de México, Estado de México.

J. Yáñez Fernández, J.A. Salaza Montoya, L. Chaires Martínez, J. Jiménez Hernández, M. Márquez Robles y E. G. Ramos Ramírez, Septiembre-Octubre 2002, Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav.

Carlos Osorio P., Eliana Icochea D, Pablo Reyna S., John Guzmán G., Fernando Cazorla M, Fernando Carcelén C, Julio.Diciembre 2010, Comparación del rendimiento productivo de pollos de carne suplementados con un probióticos versus un antibiótico, Laboratorio de Patología Aviar, Facultad de Medicina Veterinaria, Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

Liliana Romero Ríos, 2010, Tesis Evaluación del residuo suero lácteo de cabra como uso para propagación de microorganismos probióticos, Buenavista Saltillo Coahuila.

Paginas d Internet

<http://www.colmor.edu.mx/secundaria/informacion/SISTEMA%20DIGESTIVO%20-%20GALLINA%202.doc>

<http://www.ave.edu.co/info/estu/grado03/ciencias/nutria/html.htm>

<http://www.eco2site.com/News/mayo/pollo.asp>

FAO. 2004. statistical database. <http://apps.fao.org>.

ANEXOS

ENCAPSULADO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS ADICIONADOS A ALIMENTO PARA POLLOS

Criar patos y gallinas para que produzcan huevos y carne de calidad dependerá de unos buenos piensos que tengan los elementos nutritivos necesarios.

Las aves carecen de dentadura, por eso la comida entra entera a su organismo. Es el buche el aparato que se encarga de salivar la comida y el estómago, el que mezcla los alimentos con los jugos gástricos. En la molleja se produce el siguiente paso: en ella hay piedrecitas que el ave ha tragado previamente y que le ayudan a moler la comida. Los nutrientes se absorben cuando los alimentos llegan al intestino.

La comida

Los piensos de las aves tienen que tener un contenido completo de nutrientes para garantizar el buen desarrollo de sus funciones y un crecimiento sano y equilibrado, por eso, deberán tener:

- Hidratos de carbono
- Minerales
- Vitaminas
- Proteínas
- Grasas

Las cantidades establecidas de pienso varían a lo largo de la vida del animal. De hecho, una gallina o un pato que se va a destinar a carne, requieren abundante proteína en su dieta, aunque no es bueno darles demasiada proteína animal. Por otro lado, las gallinas ponedoras necesitan minerales para producir huevos.

Las semillas (de trigo, maíz, cebada, arroz, avena, sorgo, etc.) enteras o en harinas, suministran carbohidratos de calidad a las aves. La proteína vegetal puede obtenerse de las semillas de soja, algodón, frutos secos y dátiles. La grasa se encuentra en las pipas de girasol, las semillas de girasol y el cacahuete.

Para garantizar una cantidad correcta de vitaminas, los vegetales verdes y hierbas añadidas al pienso serán más que suficiente para que no les falte este tipo de nutrientes. Buenas fuentes de minerales son la cáscara de huevo y los caparzones del marisco que, triturados, pueden suministrar gran cantidad de calcio, fundamental para las gallinas ponedoras. Mucha gente de campo incluye, además, en la dieta, restos de alimentos utilizados en la cocina. Una buena opción siempre y cuando se corten, se hiervan y se mezclen después con harina.

Las aves jóvenes, pollitos o patitos, necesitan, sobre todo, proteínas para poder desarrollarse adecuadamente, mientras que las gallinas ponedoras son las que necesitan más comida. En general, las aves se nutren sobre todo de cereales.

Lo que más requieren todas las aves de corral, ya sean pavos, gallinas, patos o gansos, son buenas cantidades de grano entero y molido, que les suministre todos los hidratos de carbono necesarios. Las raciones se mezclarán bien, incorporando agua para que el pienso adquiriera un aspecto granuloso, similar al del trigo.

Adaptación de aves

Se adquirieron 200 pollos de engorda colocados en instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Se adaptaron gallineros los cuales fueron tapados con cortinas para lograr un ambiente templado ya que son aves muy delicadas.

Se dividieron por los tres tratamientos alfalfa, calabaza, suero y un testigo.

Se alimentaron con la premezcla común añadiendo el encapsulado de microorganismos probióticos en una cantidad de 1gr en 10 Kg.

Componentes del alimento

PRE-mezcla de alimento para pollos de engorda

MARCA: ALC M FINPOLLO
REG. S.A.G.A.R.P.A A-6932-017
ALCOM

Proteína	MIN	8.0%
Grasa	MIN	3.5%
Fibra	MAX	3.5%
Cenizas	MAX	8.0%
Humedad	MAX	13.0%
E. L. N		54.0%

INGREDIENTES: Sorgo, soya integral, pasta de soya, harina de pescado, pasta de canola, premezcla de vitaminas y minerales, metionina, lisina, sal, pigmentos naturales, coccidiostato, carbonato de calcio, ortofosfato.

Durante el mes de mayo se siguió encapsulando y se siguieron checando las cepas seleccionadas para que no hubiera alguna contaminación, los resultados eran favorables ya que resultaron puras y conservadas.

ANALISIS DE ALIMENTO, AGUA Y HECES FECALES.

En el mes de junio se realizo una serie de pruebas ya que se presento un problema con los pollos, comenzaron enfermos de diarrea hasta que morían.

Por lo que se decidió analizar el agua, el alimento y las heces fecales.

Prueba 1: AGUA

Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.

Diluciones 1.0/ 0.1/ 0.01/

NOM-112-SSA1-1994. Bienes y Servicios

Es una estrategia eficiente de estimación de densidades poblacionales especialmente cuando una evaluación cuantitativa de células individuales no es factible. La técnica se basa en la determinación de presencia o ausencia (pos o neg) en réplicas de diluciones consecutivas de atributos particulares de microorganismos presentes en muestras de suelo u otros ambientes.

Por lo tanto, un requisito importante de este método es la necesidad de poder reconocer un atributo particular de la población(es) en el medio de crecimiento a utilizarse. El estimado de densidad poblacional se obtiene del patrón de ocurrencia de ese atributo en diluciones seriadas y el uso de una tabla probabilística.

Preparación de material

En tubos de ensayo se colocó 15 ml de lauril sulfato o caldo lactosado se agregó 1 campana de Durham a cada tubo. 4 tubos por cada dilución, anteriormente mencionadas. Se esterilizaron a 121° C por 15 minutos. Se dejan enfriar.

Se añade 1 ml de la muestra del agua contaminada a cada tubo con las diluciones consecutivas a analizar, y se agregó una cuarta dilución de 10 ml. Los 12 tubos fueron incubados a 28° C de 24 a 48 horas.

Preparación de medios sólidos

Por otra parte se preparó:

15 tubos con 9 ml de caldo verde brillante

Agar verde brillante

Medio de enriquecimiento altamente selectivo para el aislamiento de *Salmonella* spp., excepto *S. typhi* y *S. paratyphi*, a partir de muestras clínicas, alimentos, y otros materiales de importancia sanitaria. No se recomienda para el aislamiento de *Shigella* spp.

Es de un valor excepcional cuando se investiga un gran número de muestras de heces o alimentos, por su alta capacidad de diferenciación de las colonias sospechosas.

En el medio de cultivo, la pluripeptona y el extracto de levadura, constituyen la fuente de nitrógeno, vitaminas y minerales. La lactosa y la sacarosa son los hidratos de carbono fermentables, el rojo fenol es el indicador de pH, que vira al amarillo cuando hay producción de ácido a partir de la fermentación de azúcares, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el verde brillante actúa como agente selectivo.

Fórmula (en gramos por litro)	
Pluripeptona	10.0
Extracto de levadura	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.0
Rojo fenol	0.08
Verde brillante	0.0125
Agar	20.0

Diluir 58 gr de polvo de agar verde brillante, mezclar correctamente y calentar a ebullición. Esterilizar a 121° por 15 minutos

Agar para métodos estándar

El Agar Métodos Estandar es un medio utilizado para el recuento de bacterias aeróbicas a partir de agua, aguas residuales, alimentos y productos lácteos. Este medio también es conocido como Agar Cuenta Estandar.

El Agar Métodos Estandar fue desarrollado por Buchbinder Baris and Goldstein en 1953 como un requerimiento de la American Public Health Association. Este medio se formula con los ingredientes originales. El extracto de levadura y la peptona de caseína han sido utilizados en medios diseñados para estudiar la presencia de microorganismos termofílicos en productos lácteos desde 1928.

La peptona de gelatina y el extracto de levadura proporcionan la fuente de carbono y nitrógeno.

Composición

Peptona de Caseína 5.0 Dextrosa 1.0

Extracto de Levadura 2.5 Agar Bacteriológico 15.0

Suspender 23.5 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

Agar EMB

Fórmula (en gramos por litro)	
Peptona	10.0
Lactosa	5.0
Sacarosa	5.0
Fosfato dipotásico	2.0
Agar	13.5
Eosina	0.4
Azul de metileno	0.065

Suspender 36 gr del polvo en un litro de agua destilada, mezclar y calentar hasta ebullición para disolver correctamente. Esterilizar en autoclave a 121° C por 15 minutos.

Al día siguiente se revisaron los tubos, resultaron positivos de contaminación ya que hubo producción de gas y presento turbidez.

El siguiente paso fue sembrar en medio sólido, se vació 20 um del caldo verde brillante contaminado a la caja se añadió el agar correspondiente y se dejo solidificar.

Se sellaron correctamente y se incubaron a 28° C por 24 horas

Prueba 2 y 3: Alimento y Heces fecales

En la prueba de heces fecales se analizo con cada uno de los tratamientos y del testigo.

Agua peptonada

Medio usado como diluyente y para enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de interés sanitario.

Medio de enriquecimiento no selectivo, recomendado para ser utilizado en lugar de solución fisiológica para recuperar células de enterobacterias dañadas por procesos fisicoquímicos, a los que ha sido sometido el alimento. Si es utilizado como medio base para la fermentación de hidratos de carbono, se debe adicionar el indicador de Andrade y el hidrato de carbono en cuestión.

Composición:

Fórmula (en gramos por litro)	
Peptona de carne	10.0
Cloruro de sodio	5.0

Procedimiento

Se preparo agua peptonada con 1 gr. de peptona en 1 litro de agua destilada. Se disolvió perfectamente, y se coloco 9 ml en tubos de ensayo con micropipeta.

En 90 ml de agua peptona preparada se agrego 10 ml de muestra (alimento y heces fecales). Se deja en reposo.

Tomando 1 ml de muestra contaminada se agrega al tubo numero 1, realizando diluciones hasta la 10

Preparación de medios sólidos

Agar salmonella-shigela

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento de Salmonella spp. y de algunas especies de Shigella spp. a partir de heces, alimentos y otros materiales en los cuales se sospeche su presencia.

Es un medio de cultivo selectivo y diferencial. La selectividad, esta dada por la sales biliares y el verde brillante, que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas, de la mayoría de los coliformes y el desarrollo invasor del *Proteus* spp.

Es diferencial debido a la fermentación de la lactosa, y a la formación de ácido sulfhídrico a partir del tiosulfato de sodio. Los pocos microorganismos fermentadores de lactosa capaces de desarrollar, acidifican el medio haciendo virar al rojo el indicador de pH, obteniéndose colonias rosadas o rojas sobre un fondo rojizo. *Salmonella*, *Shigella* y otros microorganismos no fermentadores de lactosa, crecen bien en el medio de cultivo, y producen colonias transparentes.

La producción de ácido sulfhídrico se evidencia como colonias con centro negro debido a la formación de sulfuro de hierro.

Composición:

Fórmula (en gramos por litro)	
Pluripeptona	5.0
Extracto de carne	5.0
Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	8.5
Citrato de sodio	8.5
Tiosulfato de sodio	8.5
Citrato férrico	1.0
Agar	13.5
Verde brillante	0.00033
Rojo neutro	0.025

Se diluyen 60 gr de polvo de Agar S-S, mezclar correctamente y calentar por unos minutos.

Agar EMB

Se sembró placa petri en cada uno de los agares y con cada dilución consecutiva se incubaron a 28° C por 24 horas.

Resultados

Se comparo resultados de acuerdo a la tabla El número más probable para series de diluciones en réplicas de cinco por nivel de dilución (Woomer, 1994)*. Dando resultado un índice del NMP por ml de >110.0 unidades formadoras de colonias.

Se revisaron todas las cajas dando como resultando colonias con morfología de Gram. negativos observándose colonias verde brillante (fluorescentes), colonias mucosas transparentes, colonias negras y blancas con un olor muy peculiar.

