



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE VETERINARIA**

Trabajo de graduación

**“Obtención de cepas autóctonas de *Bacillus*
spp. y su evaluación probiótica in vitro”**

AUTORES

Br. Oscar René Obando Rosales

Br. Yarlin Guioconda Suárez Quintero

ASESORES:

Omar Navarro Reyes MV.

Raúl Piad Barreras PhD.

Managua, Nicaragua

Octubre, 2015



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE VETERINARIA**

TEMA:

**“Obtención de cepas autóctonas de *Bacillus*
spp. y su evaluación probiótica in vitro”**

**Tesis sometida a consideración del Concejo de Investigación y
desarrollo (CID), de la Facultad de Ciencia Animal (FACA) de
la Universidad Nacional Agraria para optar al título de:**

Médico Veterinario

En el grado de Licenciatura

POR:

Br. Oscar René Obando Rosales

Br. Yarlin Guioconda Suárez Quintero

Esta tesis fue evaluada por el Concejo de Investigación y Desarrollo (CID), de la Facultad de Ciencia Animal (FACA) de la Universidad Nacional Agraria (UNA), y aprobada por el Honorable Tribunal Examinador designado para tal efecto, como requisito parcial para optar al título profesional de:

MÉDICO VETERINARIO
En el grado de Licenciatura

Miembros del Tribunal Examinador:

Mv. Julio López Flores
Presidente

Mv. Karla Marina Ríos Reyes
Secretaria (a)

Lic. Mario Romero Vargas
Vocal

Carta del tutor:

Yarlin Guioconda Suárez Quintero y Oscar René Obando Rosales han desarrollado su tesis como último requisito para optar por el título médico veterinario, en el grado de licenciatura, cuyo título es: **Obtención de cepas autóctonas de *Bacillus spp.* y su evaluación probiótica in vitro, reuniendo todos los requisitos para ser presentado como trabajo de tesis.**

Durante la realización de esta investigación los estudiantes mostraron disciplina, alto grado de responsabilidad, motivación y espíritu emprendedor en todo momento del proceso de realización de esta tesis hasta su culminación. Así mismo desarrollaron habilidades y destrezas, desarrollando un extenso análisis microbiológico para poder obtener cepas de *Bacillus* autóctonos, que sin lugar a dudas darán pautas para el desarrollo productivo pecuario del país.

Por todo lo anteriormente planteado, considero que la tesis ha cumplido con todas las normas estipuladas en el reglamento interno de nuestra Universidad Nacional Agraria, por lo cual puede ser sometida a defensa y evaluación final.

Felicito a los sustentantes por el excelente estudio desarrollado, por su dedicación e interés y por su gran esfuerzo en la realización de éste.

Atentamente:

Tutor
Mv. Omar Navarro Reyes

ÍNDICE DE CONTENIDOS

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CUADRO.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE ANEXOS	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	2
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3.1. Ubicación del área de estudio.....	3
a. Materiales.....	3
b. Equipos.....	3
c. Reactivos y Medios de cultivo	3
3.2. Duración del estudio.....	4
3.3. Análisis estadístico.....	4
3.4. Fase de campo	4
3.4.1. Preparación de materiales.....	4
3.4.2. Materiales para la toma de muestras	4
3.4.3. Muestras tomadas para estudio microbiológico en fase de campo.....	4
3.5. Fase de laboratorio	5
3.5.1. Primera fase de selección	5
3.5.2. Segunda fase de selección	6
3.5.3. Tercera fase de selección.....	6
3.5.4. Cuarta fase de selección	7
3.5.5. Quinta fase de selección.....	7

3.5.5.1.	Triple Sugar Iron (TSI).....	7
3.5.5.2.	Movilidad Indol Ornitina (MIO)	8
3.5.5.3.	Sulfuro Indol Movilidad (SIM)	8
3.5.5.4.	Red Metil Voges Proskauer (VP).....	8
3.5.5.5.	Kligler Hierro Agar (KIA)	9
3.5.5.6.	Manitol	9
3.5.5.7.	Citrato de Simons	9
3.5.5.8.	Sensibilidad a antibióticos.....	10
3.5.6.	Sexta fase de selección	10
3.5.6.1.	Bilis esculina	10
3.5.6.2.	Tolerancia a Sal y pH. Ácido	10
3.5.6.3.	Proteólisis de Caseína.....	10
3.5.6.4.	Prueba preliminar final de Halos de caseína y Conteo.....	10
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
4.1.	Características macroscópicas y microscópicas del género bacillus.....	11
4.2.	Pruebas bioquímicas.....	13
4.2.1.	Lectura de antibiograma.....	15
4.3.	Proteólisis de Caseína.....	17
4.4.	Pruebas probióticas	17
4.4.1.	Halos de hidrolisis de caseína y conteo de endosporas	17
V.	CONCLUSIÓN.....	19
VI.	RECOMENDACIONES	20
VII.	LITERATURA CITADA	21
VIII.	ANEXOS	23

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr este objetivo y por brindarme su infinita bondad y amor.

A mis padres Olmedo Obando y Bertha Rosales por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

A nuestros profesores por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis.

Al grupo ÉLITE por haberme ayudado a esforzarme durante toda la carrera.

Oscar René Obando Rosale

DEDICATORIA

A **Dios** por darme la salud, fuerzas, sabiduría y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón, por la vida y el entendimiento para enfrentar los diferentes problemas y permitirme llegar a este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi **Madre:** Mayra Quintero Calderón por sus consejos sabios y enseñarme a no desfallecer, por los ejemplos de perseverancia y constancia que la caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante, por su apoyo y amor incondicional.

A mi **Padre:** Ricardo Suárez Galeano por el deseo de superación que me ha enseñado, por su apoyo, por sus consejos, sus valores y por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien.

A **mis hermanos:** Por brindarme sus consejos e impulsarme a crecer en el ámbito profesional.

A **Fernando J. Orozco Espinoza:** Por su apoyo, comprensión y motivación.

Yarlin Guioconda Suárez Quintero

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios sobre todas las cosas por habernos permitido culminar nuestros estudios y haber logrado dar este paso tan importante en nuestras vidas.

A nuestros padres por ser el pilar fundamental en todo lo que somos, en toda nuestra educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

A nuestros asesores de tesis el Dr. Omar Navarro y el Dr. Raúl Piad por la orientación y el apoyo brindado en la realización de nuestro trabajo de graduación.

A la Universidad Nacional Agraria por haber sido nuestro centro de educación y habernos brindado las herramientas necesarias para poder culminar nuestra meta.

A la Universidad Politécnica (UPOLI) y al Laboratorio División Veterinaria por habernos facilitado el laboratorio para el uso de equipo y materiales durante el desarrollo de nuestro estudio.

A todos nuestros profesores que nos enseñaron y motivaron tanto en la profesión como en la vida, impulsándonos siempre a seguir adelante.

Oscar René Obando Rosales

Yarlin Guioconda Suárez Quintero

ÍNDICE DE CUADRO

SECCIÓN	PÁGINA
Cuadro 1. <i>Resultados obtenidos en la bioquímica fueron los que se presentan en el siguiente cuadro.....</i>	14

ÍNDICE DE FIGURAS

SECCIÓN	PÁGINA
Figura 1. <i>Cepas obtenidas de prueba de shock térmico</i>	11
Figura 2. <i>Resultados de evaluación macroscópica</i>	12
Figura 3. <i>Resultados de evaluación microscópica</i>	12
Figura 4. <i>Resultados de prueba catalasa</i>	13
Figura 5. <i>Sensibilidad a antibióticos de cepa X5⁻⁹ (1) CD</i>	15
Figura 6. <i>Sensibilidad a antibióticos de cepa X5⁻⁹ (1) C</i>	16
Figura 7. <i>Sensibilidad a antibióticos de cepa X2⁻¹⁰ (2)</i>	16
Figura 8. <i>Sensibilidad a antibióticos de cepa α⁻⁸ (1)</i>	17
Figura 9. <i>Lectura de formación de halos de hidrólisis</i>	18

ÍNDICE DE ANEXOS

SECCIÓN	PÁGINA
<i>Anexo 1. Lectura de pruebas de catalasa.....</i>	23
<i>Anexo 2. Conteo de células en cámara de Neubauer.....</i>	24
<i>Anexo 3. Preparación de cristalería.....</i>	25
<i>Anexo 4. Preparación de materiales.....</i>	25
<i>Anexo 5. Preparación de desinfectantes.....</i>	25
<i>Anexo 6. Extracción de ciegos de pollo.....</i>	25
<i>Anexo 7. Baño maría.....</i>	25
<i>Anexo 8. Cepa aislada de shock térmico.....</i>	25
<i>Anexo 9. Cepa aislada de shock térmico.....</i>	25
<i>Anexo 10. Reactivo para tinción de Gram.....</i>	25
<i>Anexo 11. Aplicación de Lugol a frotis.....</i>	26
<i>Anexo 12. Aplicación de safranina a frotis.....</i>	26
<i>Anexo 13. Tinción de endosporas.....</i>	26
<i>Anexo 14. Bacillus Gram positivo.....</i>	26
<i>Anexo 15. Bacilos formando cadenas.....</i>	26
<i>Anexo 16. Bacilos únicos y múltiples.....</i>	26
<i>Anexo 17. Reacción a prueba de catalasa.....</i>	26
<i>Anexo 18. Medios de cultivo utilizados.....</i>	26
<i>Anexo 19. Preparación de medios.....</i>	27
<i>Anexo 20. Preparación de agar leche.....</i>	27
<i>Anexo 21. Esterilización de medios.....</i>	27

Anexo 22. <i>Conservación de cepas en caldo leche</i>	27
Anexo 23. <i>Conservación de medios para siembra</i>	27
Anexo 24. <i>Siembra de bioquímica</i>	27
Anexo 25. <i>Siembra en Bilis Esculina</i>	27
Anexo 26. <i>Bioquímica en incubadora</i>	27
Anexo 27. <i>Reacción a prueba Bioquímica</i>	28
Anexo 28. <i>Reacción de MIO</i>	28
Anexo 28. <i>Reacción de SIM</i>	28
Anexo 29. <i>Reacción a TSI</i>	28
Anexo 30. <i>Reacción de Citrato</i>	28
Anexo 31. <i>Reacción de TSI</i>	28
Anexo 32. <i>Sensibilidad a antibióticos</i>	29
Anexo 33. <i>Proteólisis de Caseína</i>	29
Anexo 34. <i>Crecimiento en Bilis Esculina</i>	29
Anexo 35. <i>Siembra para pruebas de hidrólisis de caseína</i>	29
Anexo 36. <i>Halos de hidrólisis de caseína</i>	29
Anexo 37. <i>Selección de bacterias Gram positivas</i>	30
Anexo 38. <i>Flujograma de pruebas bioquímicas del bacilo y de pruebas probióticas</i>	31

Obando Rosales O. R; Suárez Quintero Y. G; 2015. Obtención de cepas autóctonas de *Bacillus spp.* y su evaluación probiótica *in vitro*”. Tesis para optar al título de Médico Veterinario el grado de Licenciatura. Managua, Nicaragua, Facultad de ciencia Animal de la Universidad Nacional Agraria (UNA).

RESUMEN

El presente trabajo se enfocó en la obtención de la cepa de *Bacillus spp.*, las muestras evaluadas fueron sangre, leche, concentrado, heces y ciego de pollo; estas se procesaron mediante técnicas convencionales de laboratorio para lograr adquirir una cepa pura de este bacilo, para esto se realizaron pruebas macroscópicas, microscópicas y bioquímicas que determinaron la identificación microbiológica del *Bacillus subtilis*. Las pruebas de proteólisis de caseína con la cual se determinó las cepas que poseían actividad proteolítica y enzimática y las pruebas de resistencia de pH y sales biliares que se utilizaron para determinar la actividad probiótica de la cepa *in vitro*. Al finalizar el análisis, se obtuvieron un total de tres cepas con la actividad probiótica requerida “X5⁻⁹ (2)C, X5⁻⁹ (2)CD, X2⁻¹⁰ (2)”, pero se eligió aquella que obtuvo los parámetros óptimos en la prueba de halo de hidrólisis de caseína siendo la cepa identificada con el código X5⁻⁹ (2)C la cual pertenecía a las muestras tomadas de los ciegos derechos de los pollos. Cabe destacar que este estudio constituye un proyecto innovador en el que se implementó tecnología existente en el país, con la finalidad de desarrollar la producción de cepas autóctonas para su empleo en sustitución de antibióticos promotores del crecimiento por un probiótico nacional elaborado a nivel industrial.

Palabras claves: Probióticos, *Bacillus spp.*, Endosporas, Cepas, Autóctonas.

ABSTRACT

This work focused on obtaining the strain of *Bacillus* spp, the samples tested were blood, milk, concentrated chicken feces and blind.; these were processed by standard laboratory techniques to achieve acquire a pure strain of the bacillus, to this macroscopic, microscopic and biochemical tests that determined the microbiological identification of *Bacillus subtilis* were performed. Testing proteolysis of casein which possessed proteolytic strains and enzyme activity and resistance tests of pH and bile salts that were used to determine the activity of the probiotic strain was determined in vitro. Upon completion of the analysis, a total of three strains were obtained with probiotic activity required "X5-9 (2) C, X5-9 (2) CD, X2-10 (2)", but that he got elected parameters best in test halo of hydrolysis of casein strain being identified with the X5-9 (2) C code which belonged to the samples taken from the blind rights chickens. Note that this study is an innovative project that existing technology was implemented in the country, in order to develop the production of indigenous strains for use in replacing antibiotic growth promoters by a national probiotic developed at industrial level.

Keywords: Probiotics, *Bacillus* spp, Endospores, strains, Native..

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos veinte años se han venido realizando investigaciones acerca de la utilización de microorganismos que poseen propiedades probióticas (Rodríguez, 2011), esto se ha hecho con el objetivo de sustituir los antibióticos que se utilizan hasta la fecha en la nutrición animal (Lara & Burgos, 2014).

Estudios recientes han descrito que el *Bacillus spp* produce ciertas enzimas las cuales descomponen ciertas moléculas presentes en los alimentos y las transforman en nutrientes más simples ayudando así a mejorar la utilización de los alimentos (Cuervo, 2010). Según Bruzos, los probióticos “son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas como suplemento alimenticio, aportan beneficios para la salud de quien los ingiere mediante el mejoramiento de su equilibrio microbiano intestinal” (Organización Mundial de Gastroenterología, 2008)

Para la selección de cepas con propiedades probióticas se deben realizar un conjunto de pruebas donde se demuestre que los microorganismos poseen cualidades probióticas y se esté seguro no causaran perjuicios en la producción como al consumidor (Castejón, 2008).

Debido a la poca investigación científica que existe en nuestro país y a la falta de laboratorios enfocados a elaborar este tipo de productos, todos los probióticos utilizados en las granjas de nuestro país son importados, como resultado los precios son elevados y los pequeños o medianos productores no tienen los recursos necesarios para hacer uso de ellos (Gonzales & Piad, 2011).

En la actualidad en nuestro país debido al crecimiento significativo de la población nicaragüense en los últimos diez años (INIDE, 2015) como también al incremento en las exportaciones gracias a los tratados de libre comercio, se ha tenido que aumentar el nivel de producción en las granjas de las diversas especies existentes (PRONicaragua, 2015), por lo que se ha hecho necesario modificar las técnicas de producción en la actualidad, implementando el uso adecuado de los probióticos en la alimentación y obtener de esta forma una mayor ganancia tanto cualitativa como cuantitativa de forma que se puedan satisfacer las demandas internas y externas.

El propósito de este trabajo es obtener una cepa de *Bacillus spp* autóctona con actividad probiótica de la cual se pueda formular un producto probiótico que mediante una buena formulación sería capaz de competir con productos importados, esto traería como beneficio el reconocimiento a la Facultad de Ciencia Animal por un importante aporte médico que puede ayudar al desarrollo de la producción en nuestro país

II. OBJETIVOS

2.1.Objetivo general

- Obtener cepas autóctonas de *Bacillus spp.* para ser usadas como probióticos.

2.2.Objetivos Específicos

- Identificar cepas autóctonas de *Bacillus spp.*
- Analizar *in vitro* la acción probiótica de *Bacillus spp* seleccionada.
- Determinar cepa con mejor actividad probiótica.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del área de estudio

El estudio se realizó en el municipio de Managua el cual limita al Norte con el Lago Xolotlán, al Sur con Municipio de El Crucero, al Este Municipio de Tipitapa, Nindirí y Ticuantepe y al Oeste Municipio Villa Carlos Fonseca y Ciudad Sandino

Posee una superficie municipal de 289 km² y una superficie del área urbana de 150.5 km². Se encuentra a una altitud mínima de 43 metros sobre el nivel del mar, posee un clima tropical de sabana, caracterizado por una prolongada estación seca y por temperaturas altas todo el año, que van desde los 27° C a 34° C. El promedio de precipitaciones anual se encuentra entre los 1,100 y 1,600 mm con una humedad relativa del 70.5 (INETER, 2012)

Los procedimientos microbiológicos de aislamiento, identificación y actividad probiótica se realizaron en: el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia Animal (FACA) el cual pertenece a la Universidad Nacional Agraria (UNA), donde se preparó materiales de muestras, para ser procesadas en el Centro Biotecnológico (CEBIOT) de la Universidad Politécnica (UPOLI), las muestras cecales de aves fueron obtenidas siguiendo protocolo de necropsia en el Laboratorio de Diagnóstico Clínico Veterinario (División Veterinaria).

3.1.1. Materiales utilizados

a. Materiales

Tubos para caldo leche 2 ml, tubos con roscas de 10 ml y 23 ml, tapa roscas para tubos de ensayo, gradillas tipo alfiler para tubos de ensayo, cuchara espátula, placas Petri sencillas de 15 ml, placas Petri dobles, beakers, 100, 250 y 600 ml, probeta de 25 y 50 ml, erlenmeyer de 25, 50 ml, 250, 500 y 1000 ml, asas de siembra metálicas circulares y rectas, jarra para anaerobiosis, porta objeto, cubre objeto, pipetas de transferencia de 8ml plástica, pipeta manual de 10 ml, pipetas automáticas, pipetas serológicas de vidrio de 1, 5 y 10 ml, puntas de pipetas, embudo de vidrio, tubos con EDTA, guantes látex, tapa bocas, marcador permanente, guantes para aislamiento de calor, cepillos de limpieza, kit de antibiograma, para film, wash bottles, magnetos, Petri dish rack, cinta testigo, escobillones, detergente, toallas de papel, destilador de Agua, otros, (Drew, 2010).

b. Equipos

Incubadora, autoclave, Ph-metro, agitador vórtex, balanza electrónica, baño maría, hotplate, refrigerador, centrifuga multiusos, microscopio, cabina de flujo laminar, cámara de Neubauer, contador de colonias, mechero, talli counter, cronómetros, kit de disección, Fermentador de Banco (Drew, 2010).

c. Reactivos y Medios de cultivo

Agar, Caseína, Kligle Iron Agar (KIA), Bilis esculina (BE), Lisine Iron Agar (LIA), Muller Hinton (MH), Nutriente Agar (NA), Simon Citrate Agar (SCA), Triple Sugar Iron (TSI), Sulfuro Indol Movilidad (SIM), Caldo Nutriente, Plate count Agar (PCA), Methyl Red Vogues Proskauer (VP), Manitol Indol Ornitina (MIO), Xilosa Lactosa Sacarosa (XLD),

Verde Malaquita, Kit de Gram, Medio Urea, reactivo de Kovac's, Peróxido de Hidrógeno(H₂O₂), Oxi Bilis, Agua Peptonada, Solución Salina, Agua Destilada (Bailón & González, 2003).

3.2.Duración del estudio

El estudio se realizó en el período de enero a octubre del año 2015. El desarrollo de esta investigación se dividió en dos fases (fase de campo y fase de laboratorio), las cuales serán explicadas en su respectivo acápite.

3.3.Análisis estadístico

En el análisis estadístico se utilizó el software MINITAB 2014, en el cual se introdujeron los datos obtenidos de la prueba probiótica (hidrólisis de caseína), para determinar cuál poseía mayor actividad enzimática para ser utilizada como probiótico.

3.4.Fase de campo

3.4.1. Preparación de materiales

Se seleccionó materiales de reposición y cristalería, usando esterilización por calor húmedo (autoclave), calor seco (horno Pasteur) y agentes desinfectantes (Fenol al 10%, sol. Yodadas), los cuales fueron preparadas en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia Animal (FACA-UNA) de la siguiente manera:

3.4.2. Materiales para la toma de muestras

- Esterilización de materiales: tubos de ensayo, placas de Petri, beakers, espátulas.
- Preparación de materiales: parafilm, guantes látex, bolsas plásticas de dos libras, termo, embalajes fríos, marcadores, libreta de apuntes, cámara.
- Preparación de soluciones: Fenol al 10%, solución yodada.

3.4.3. Muestras tomadas para estudio microbiológico en fase de campo

Para este estudio se tomaron 70 muestras que fueron identificadas con los siguientes códigos:

1. Concentrado de pollos: Fue proporcionado por el pollo estrella siendo tomadas las muestras de concentrado directamente de los sacos que se suministrarían a los pollos. A estas muestras se les identifico con la simbología $\alpha 1$ hasta $\alpha 10$.
2. Heces frescas de Bovino: Se extrajeron directamente del recto de los bovinos utilizando guantes de palpar y fueron depositadas en bolsas plásticas de 2 lb. Estas muestras fueron identificadas con las letras desde la A hasta la J.
3. Heces secas de bovino: Se recolectaron de las heces encontradas en el suelo del corral y fueron depositadas en bolsas plásticas de 2 lb. Las muestras se identificaron con la numeración del 1 al 10.

4. Sangre de rastros bovino: las muestras fueron recolectadas de la sangre que se encontraba coagulada en el piso del rastro luego del faenado, recolectándolas en bolsas plásticas de 2 lb identificándolas desde la S1 hasta S10.
5. Sangre de matadero bovino: fueron recolectadas de la misma forma que las muestras de sangre de rastro, pero estas fueron identificadas de la Sa hasta Sj.
6. Ciego de pollo: se compraron 5 pollos de la línea Cobb de cuarenta y dos días de edad y se trasladaron hasta el laboratorio de División veterinaria en donde fueron sacrificados para tomar las muestras directamente del ciego de los pollos identificando con la letra “X” los ciegos derechos y con “Y” los ciegos izquierdos.
7. Leche sin hervir: las muestras fueron obtenidas de un directamente de los cuartos mamarios de las vacas y también se tomaron muestras de los recipientes en donde se almacena la leche. Se recolectaron en bolsas plásticas de 2 lb y se identificaron con números romanos desde el I hasta el X.

3.5.Fase de laboratorio

Las muestras recolectadas se codificaron y fueron conservadas en termos con embalajes fríos, según normativa de cadena de frío, para ser trasladadas al laboratorio de Biotecnología (CeBiot), y ser procesadas.

Las muestras fueron evaluadas mediante técnicas rutinarias de microbiología (tinción de Gram, cultivo de cepas en agar nutriente), pero la mayor parte del estudio se basó en la ejecución de pruebas microbiológicas especiales (Tinción de esporas, Catalasa, TSI, KIA, SIM, MIO, MANITOL, CITRATO SIMONS, VOGES PROSKAUER, Ph, NaCl, PROTEOLISIS DE CASINA E HDRÓLISIS DE CASEINA), para la determinación e identificación del microorganismo que se evaluó.

3.5.1. Primera fase de selección

El total de muestras obtenidas (70 Muestras) se sometieron a Shock térmicos, para realizarse diluciones seriadas hasta 10^{-10} , de las cuales las soluciones 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} fueron inoculadas en Plate Count Agar por duplicados a 37 °C durante 24 horas, para un total de cuatrocientas veinte repeticiones procesadas en la primera fase de selección, de las cuales solo en ciento veinte hubo crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC).

Shock térmico consiste en llevar a 71°C durante cinco minutos en baño María para obtener bacilos en fase vegetativa y eliminar contaminantes (Collins & Lyne, 1989).

3.5.2. Segunda fase de selección

Las cuatrocientas veinte repeticiones que fueron inoculadas y evaluadas por shock térmico según la literatura, solamente un total de ciento veinte cepas presentaron crecimiento de las cuales solo 46 poseían morfología macroscópica característica del género Bacilos: Crecimiento de colonias en forma de abanico, crecimiento de colonias en masa, cremosa, rugosa, seca, lisa, húmeda y crecimiento de colonias con bordes dentados (Realpe & Hernández, 2002).

3.5.3. Tercera fase de selección

De un total cuarenta y seis cepas que entraron a la tercera fase de selección se les realizó la observación de características Microscópicas” mediante la Tinción de Gram y Tinción de endosporas ("verde Malaquita") para dar un total de veinte y seis cepas al finalizar ambos procedimientos.

Procedimiento de tinción de Gram:

- ✓ Se aplicó una gota de solución salina sobre el portaobjetos
- ✓ Se realizó la fijación de la muestra mediante flameado del porta objeto.
- ✓ Se realizó un frotis del inóculo sobre un cubre objeto.
- ✓ Se adicionó cristal violeta durante un minuto.
- ✓ Se lavó con agua destilada para quitar el exceso de cristal violeta.
- ✓ Se añadió solución de Lugol durante 1 minuto.
- ✓ Se lavó con agua destilada de forma que se eliminó el excedente de la tinción.
- ✓ Se le adicionó alcohol-acetona (decolorante Gram) por 30 segundos.
- ✓ Se lavó con agua destilada.
- ✓ Se le adicionó tinción (safranina) durante 1-2 minutos.
- ✓ Se lavó con agua destilada.
- ✓ Finalmente se dejó secar para ser observada al microscopio con aceite de inmersión.

Esta tinción nos permitió observar a las bacterias Gram positivas o negativas de forma que para discriminar aquellas que nos dieron Gram negativas, y que no tuvieran la forma bacilar siendo que las características esenciales en los *Bacillus spp.* Es ser bacillos Gram positivos (Haro & Ruiz, 2012)

Posterior a la tinción de Gram se realizó la tinción de endosporas (verde malaquita) de la siguiente manera

1. Se prepararon las fijaciones bacterianas en los portaobjetos.
2. Se adicionó verde malaquita a las fijaciones en el porta objeto.
3. Se colocó la tinción en vapores por 10 minutos sin dejar secar la muestra.
4. Se lavó con agua el resto de colorante.
5. Se tiñó con safranina durante un minuto.
6. Se lavó con agua el resto de colorante.
7. Se dejó secar.

8. Observar al microscopio con aceite de inmersión.

Esta prueba se realizó para determinar la presencia y posición de las endosporas en aquellas bacterias que ya se consideraban Gram positivas lo cual es característico en los *Bacillus* con actividad probiótica (Beaker, 1970)

3.5.4. Cuarta fase de selección

Consistió en realizar la “Prueba de Catalasa”. La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva, ya que los *Bacillus spp.* son bacterias aerobias estrictas o facultativas (Koneman & Winn, 2006)

De la tercera fase de selección con un total de 26 cepas, ocho de estas fueron seleccionadas por la capacidad de descomponer el peróxido de hidrogeno en H₂O y O₂, las cepas restantes se descartaron.

Esta prueba se realizó de la siguiente manera:

1. Se colocó con un asa bacteriológica estéril la parte de una colonia sobre un porta objeto.
2. Se le adicionó una gota de agua oxigenada sobre un portaobjetos con ayuda de una pipeta Pasteur.
3. Se observó la reacción de la muestra y se determinó positiva aquellas que presentaron formación de burbujas.

3.5.5. Quinta fase de selección

Se sometieron las 8 cepas pre-finalistas a una batería de “Pruebas Bioquímicas” (Milián, 2008) y también a “Sensibilidad Antibiótica”. Para realizar la identificación de las cepas candidatas de *Bacillus spp.* Dentro de las pruebas bioquímicas realizadas están las siguientes:

3.5.5.1. Triple Sugar Iron (TSI)

Esta prueba se realizó con medios de cultivo en tubos de ensayo en forma de pico de flauta. El medio de cultivo estéril posee un tono rojo oscuro, pero con la reacción tiende a cambiar de color o tonalidad.

1. Superficie alcalina/profundidad ácida (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.
2. Superficie ácida/Profundidad ácida (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.
3. Superficie alcalina/Profundidad alcalina (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.
4. La presencia de burbujas o la ruptura del medio de cultivo indican que el microorganismo produce gas.
5. El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

3.5.5.2. Movilidad Indol Ornitina (MIO)

Este medio se preparó en tubos de ensayo en posición vertical el cual estéril presenta una tonalidad púrpura, color que cambia frente a un microorganismo de la siguiente manera.

a. Movilidad:

- Resultado positivo: Presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra.
- Resultado negativo: Crecimiento solamente en la línea de siembra.

b. Ornitina:

- Resultado positivo: Color púrpura.
- Resultado negativo: Color amarillo. A veces se puede desarrollar un color violáceo en la superficie del medio.

c. Prueba del indol:

Reactivo de Kovac's

La prueba de indol se realiza una vez que se ha determinado la movilidad y la prueba de ornitina.

- Resultado positivo: Color rojo al agregar el reactivo revelador formando anillo.
- Resultado negativo: El color del reactivo revelador permanece incoloro amarillento.

3.5.5.3. Sulfuro Indol Movilidad (SIM)

El medio SIM es un medio semisólido el cual o utilizamos para determinar la movilidad de la cepa inoculada en él. Por ser semisólido se trabaja en tubos en forma vertical. Tiene un color amarillo claro el cual varía al inocular un cultivo en él medio y se puede observar la reacción de forma fácil.

- ✓ **Cepas móviles:** Producen turbidez del medio, que se extiende más allá de la línea de siembra.
- ✓ **Cepas inmóviles:** El crecimiento se observa solamente en la línea de siembra.
- ✓ **Cepas SH2 positivas:** Ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio.
- ✓ **Cepas SH2 negativas:** El medio permanece sin cambio de color.
- ✓ **Cepas indol positivas:** Desarrollo de color rojo luego de agregar el reactivo de Kovac's o de Erlich.
- ✓ **Cepas indol negativas:** Sin cambio de color

3.5.5.4. Red Metil Voges Proskauer (VP)

Este tipo de medio, al igual que la gran mayoría de pruebas bioquímicas se realizó en tubos de ensayo. Para la observación completa de sus resultados debe de interactuar con otros reactivos como son:

- **Rojo de metilo:** Se agregan 3 gotas del reactivo de metilo, si en la superficie del medio aparece un color rojo intenso es RM (+) = microorganismos que utilizan la glucosa fermentándola hasta llegar a un pH menor a 4,4.
- **VP:** Se agrega 0.6 ml de alfa-naftol seguidos de 0,2 ml de KOH al 40%. Es esencial que los reactivos se agreguen en este orden. El tubo se sacude suavemente y luego se deja quieto de 10 a 15 min. La aparición de color rojo = prueba (+) (presencia de acetil-metil-carbinol).

3.5.5.5. Kligler Hierro Agar (KIA)

Este medio de cultivo fue sembrado en tubos de ensayo con forma de pico de flauta con el objetivo de determinar en qué parte del medio es que tiene mayor contacto el microorganismo y de esta forma obtener los resultados.

1. Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.
2. Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, y lactosa.
3. Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.
4. La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas.
5. El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

3.5.5.6. Manitol

Para la evaluación de esta prueba se prepara el medio en tubos de ensayo con la forma de pico de flauta largo. Este método lo utilizamos para determinar en qué parte del medio tiene mayor interacción el microorganismo y poder evaluar de esta manera como responde a la prueba.

Microorganismos fermentadores de manitol: Colonias de color amarillo rodeadas o no de un halo amarillo. Microorganismos no fermentadores de manitol: colonias del color del medio, rojas rodeadas o no de halo rojizo-púrpura.

3.5.5.7. Citrato de Simons

Al igual que las pruebas anteriores este medio de cultivo se preparó en tubos de ensayo en donde la superficie del medio obtuviera un ángulo de 45° esto con el objetivo de determinar en donde ejerce mayor acción el microorganismo.

El microorganismo utiliza citrato como única fuente de carbono en su metabolismo, se produce alcalinización del medio de cultivo pasando éste a color azul intenso, lo cual indica prueba positiva para el citrato.

3.5.5.8. Sensibilidad a antibióticos

En la realización de la prueba a la sensibilidad del antibiograma se utilizaron los siguientes antibióticos: PENICILINA, ERITROMICINA, KANAMICINA, TETRACICLINA. Se realizó con el objetivo de la diferenciación del género de *Bacillus spp.*

3.5.6. Sexta fase de selección

En esta fase de preselección ocho cepas que fueron identificadas por pruebas bioquímicas se determinó que solo cuatro de estas cumplían con los requerimientos del bacilo.

3.5.6.1. Bilis esculina

Las bacterias que hidrolizan la esculina en presencia de iones de hierro forman un compuesto de color verde oliva hasta negro, de esta forma inhibiendo el desarrollo de la flora acompañante.

➤ **Interpretación**

- Positiva: se observa un oscurecimiento o ennegrecimiento del medio de cultivo
- Negativo: ausencia de oscurecimiento del medio de cultivo.

3.5.6.2. Tolerancia a Sal y pH. Ácido

Los microorganismos candidatos como probióticos deben tener la capacidad de soportar variaciones en el pH y sal (microorganismos tolerantes a la sal). El motivo de esto es que ellos deban pasar por el tracto gastrointestinal y soportar todas estas variaciones.

3.5.6.3. Proteólisis de Caseína

Para ver la actividad proteolítica de la cepa, las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas, se usan para la digestión molecular y la reducción de proteínas no deseadas, su rol fisiológico va desde la digestión de las proteínas de los alimentos hasta procesos como coagulación de la sangre por medio de la trombina.

3.5.6.4. Prueba preliminar final de Halos de caseína y Conteo

De las pruebas bioquímicas se obtuvo cuatro cepas las que fueron sometidas a la siguiente fase:

- **HIDROLISIS DE CASEINA:** Para ver la producción de enzimas hidrolíticas que son las que ayudan a mejorar la utilización de los alimentos y las transforman en nutrientes más simples. Sólo las bacterias del género *Bacillus* (*B. thuringiensis* y *B. subtilis*) hidrolizan la caseína.
- **CONTEO PRELIMINAR DE ENDOSPORAS POR CAMARA DE NEUBAUER:** Para determinar la cantidad de endosporas por ml en cada una de diluciones y tener en consideración la actividad de hidrolisis en el agar caseína.

Obteniendo un nuevo resultado de tres cepas con mejor halo de hidrólisis, seleccionando aquella cepa que presento mejor halo de hidrolisis de caseína.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las 70 muestras obtenidas de siete sustratos con probabilidades de obtener cepas de *Bacillus spp.* autóctonas que fueron sometida a Shock térmico y diluciones seriadas que iban de 10^{-1} hasta 10^{-10} , de las cuales se tomaron las tres últimas diluciones y cultivadas por duplicados para obtener un total de 420 cepas para ser evaluadas e identificadas por pruebas bioquímicas y pruebas probióticas in vitro y determinar cuál cepa sería la candidata para ser sometida a estudios posteriores in vivo.

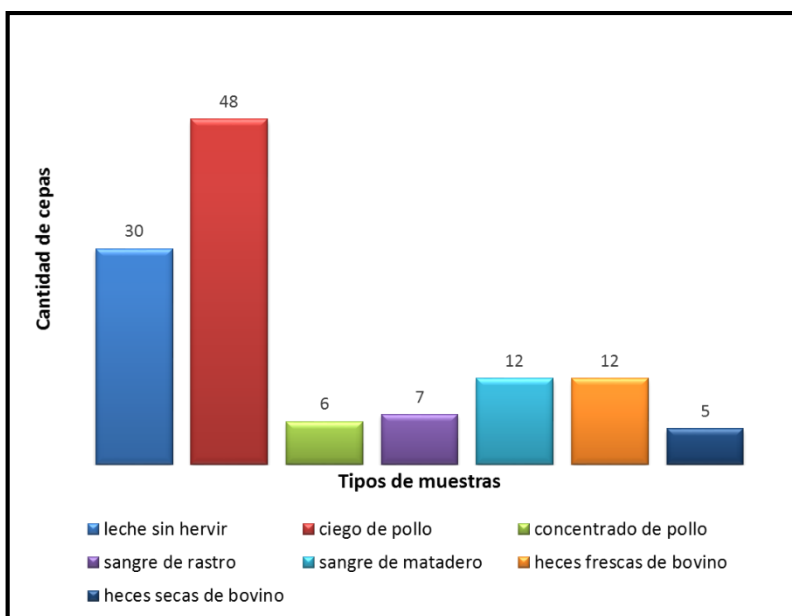


Figura 1. Resultados obtenidos de shock térmico.

4.1. Características macroscópicas y microscópicas del género *Bacillus*.

El género *Bacillus* poseen características macroscópicas con colonias morfológicamente en forma de abanico, crecimiento de colonias en masa, cremosa, rugosa, seca, lisa, húmeda y crecimiento de colonias con bordes dentados. A través de esta prueba se determinó que de 420 cepas sometidas a shock térmico 120 cepas mostraron crecimiento en las placas con PCA teniendo el siguiente resultado código; A-J (heces frescas) 5 cepas, Código 1-10 (heces secas) 12 cepas, código S1-S10 (sangre de rastro) 6 cepas, código Sa-Sj (sangre de matadero) 7 cepas, código X1-X5 (ciego derecho de pollo), Y1-Y5 (ciego izquierdo de pollo) 40 cepas, código números romanos I-X (Leche sin hervir) 30 cepas, código $\alpha 1$ - $\alpha 10$ (concentrado de pollo) 12 cepas.

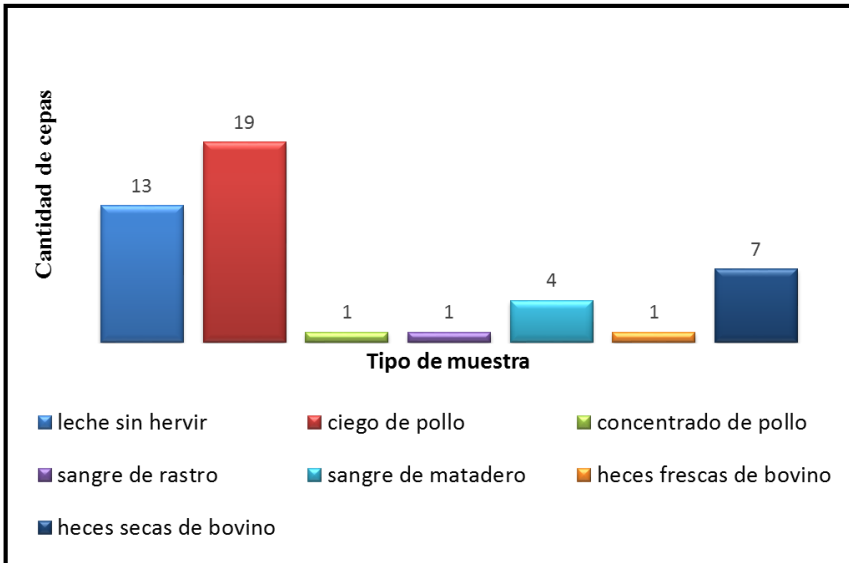


Figura 2. Resultados de evaluación macroscópica.

Las 120 cepas sometidas a crecidas en PCA luego de shock térmico 46 poseían las características macroscópicas necesarias para ser incluidas dentro del género bacilos. Teniendo el siguiente resultado código; A-J (heces frescas) 1 cepa, Código 1-10 (heces secas) 7 cepas, código S1-S10 (sangre de rastro) 1 cepa, código Sa-Sj (sangre de matadero) 4 cepas, código X1-X5 (ciego derecho de pollo), Y1-Y5 (ciego izquierdo de pollo) 19 cepas, código números romanos I-X (Leche sin hervir) 13 cepas, código α 1- α 10 (concentrado de pollo) 1 cepa.

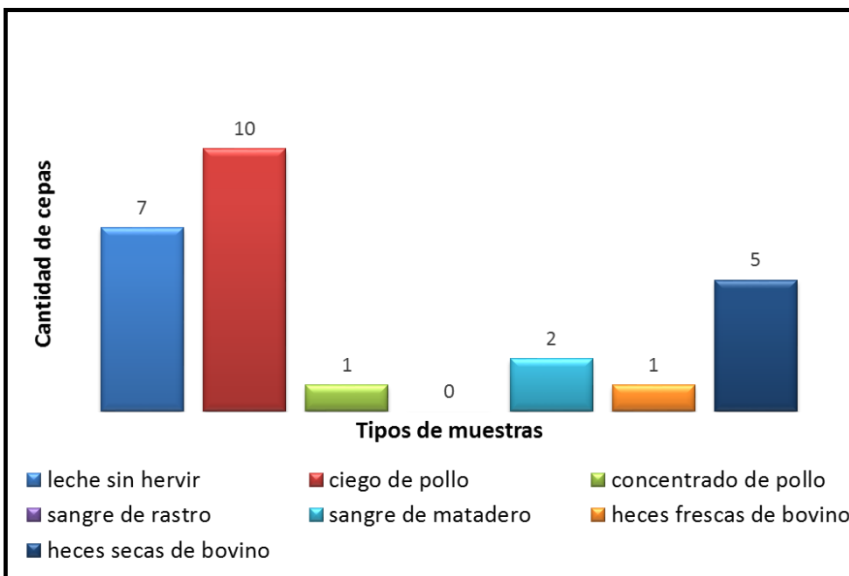


Figura 3. Resultados de evaluación microscópica (Gram y Verde Malaquita).

Los bacilos poseen características tintoriales que le permiten colorearse según Gram como Bacillus Gram positivos mostrando agrupación en forma de cadena o en algunas ocasiones encontrarse solos, otras características tintoriales que poseen estos microorganismos es que se observa endosporas que pueden ser centrales, terminales, subterminales, deformantes o no deformantes, se observó usando verde malaquita, Bacillus con endosporas centrales no deformantes, obteniendo un total de 26 cepas con los siguientes resultados código; A-J (heces frescas) 1 cepa, Código 1-10 (heces secas) 5 cepas, código S1-S10 (sangre de rastro) 0 cepas, código Sa-Sj (sangre de matadero) 2 cepas, código X1-X5(ciego derecho de pollo), Y1-Y5 (ciego izquierdo de pollo) 10 cepas, código números romanos I-X (Leche sin hervir) 7 cepas, código α 1- α 10 (concentrado de pollo) 1 cepa.

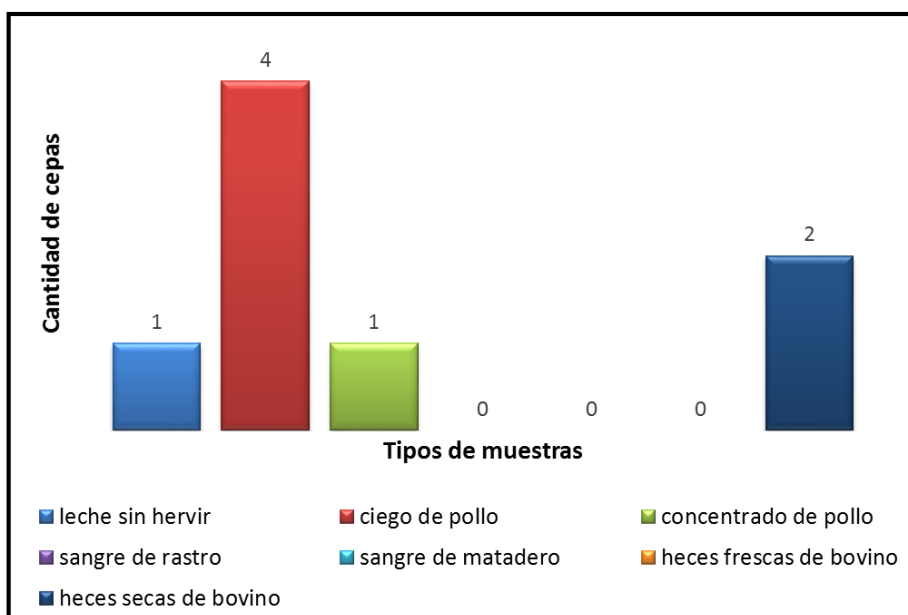


Figura 4. Resultados de prueba de Catalasa.

4.2. Pruebas bioquímicas

Cuervo en el 2010 evaluó el biofertilizante KODIAC de donde aisló una cepa que presento tinción de Gram positiva, con endosporas central y crecimiento aeróbico, catalasa positiva, presenta hidrólisis del almidón y reduce los nitratos, no produce indol, forma escasa cantidad de ácido sulfúrico, presenta crecimiento en NaCl al 7%, tiene reacción positiva Voges Proskauer, es manitol negativo y utiliza el citrato. Por base a los resultados anteriores la cepa K1 corresponde a la identificación del *Bacillus subtilis* según la literatura del Manual Bergey's, 2000.

Las pruebas bioquímicas y pruebas especiales microbiológicas permiten la identificación de géneros y especies de bacterias en muchos aislamientos, usando reactivos y medios diferenciales que permiten ver el metabolismo y actividad enzimática de los microorganismos a través de marcadores de pH que permiten un viraje del color del medio, de 26 cepas sometidas a esta prueba, ocho cepas fueron seleccionadas por la capacidad de

descomponer el peróxido de hidrogeno en H₂O y O₂, con los siguientes resultados código; A-J (heces frescas) 0 cepas, Código 1-10 (heces secas) 2 cepas, código S1-S10 (sangre de rastro) 0 cepas, código Sa-Sj (sangre de matadero) 0 cepas, código X1-X5(ciego derecho de pollo), Y1-Y5 (ciego izquierdo de pollo) 4 cepas, código números romanos I-X (Leche sin hervir) 1 cepa, código α1- α10 (concentrado de pollo) 1 cepa.

Las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de las cepas consideradas como bacillos fueron las siguientes; TSI, KIA, Citrato de Simons, VP, Manitol, MIO, SIM y pruebas de sensibilidad a antibióticos (Penicilina, Kanamicina, Eritromicina y Oxitetraciclina), dando como resultados la identificación por microbiología convencional de 4 cepas X5⁻⁹ (2)C Ciego derecho de pollo, X5⁻⁹ (2)CD ciego derecho de pollo X2⁻¹⁰ (2) ciego derecho de pollo, α⁻⁸ (1) de concentrado para pollos de engorde como *Bacillus subtilis*.

Cuadro 1. Resultados obtenidos en la bioquímica

Nº	CEPA	TSI	KIA	CS	VP	MAN	MIO	SIM
1	8 ⁻⁹ (2) <i>B. Cereus</i>	K/K SH4	K/K	+	+	-	Ornitina + Movilidad + Indol -	Sulfuro + Movilidad + Indol -
2	8 ⁻⁹ (1) <i>B. Cereus</i>	K/K	K/K	+	+	-	Ornitina + Movilidad + Indol -	Sulfuro - Movilidad + Indol -
3	X5 ⁻⁹ (2) C <i>B. subtilis</i>	K/A	K/K	+	+	+	Ornitina - Movilidad + Indol -	Sulfuro - Movilidad + Indol -
4	X5 ⁻⁹ (2) CD <i>B. subtilis</i>	K/A	K/A	+	+	+	Ornitina - Movilidad + Indol -	Sulfuro - Movilidad + Indol -
5	VI ⁻⁸ (1) <i>B.Thuringensis</i>	K/K	K/A	+	+	+	Ornitina + Movilidad+ Indol -	Sulfuro - Movilidad - Indol -
6	α ⁻⁸ (1) <i>B. Cereus</i>	K/K	K/K	+	+	-	Ornitina + Movilidad + Indol -	Sulfuro - Movilidad + Indol -
7	X5 ⁻⁹ (2) Thuringensis	K/K	K/A	+	+	-	Ornitina - Movilidad + Indol -	Sulfuro - Movilidad + Indol -
8	X2 ⁻¹⁰ (2) <i>B. subtilis</i>	K/A	K/K	+	+	+	Ornitina - Movilidad + Indol -	Sulfuro - Movilidad + Indol -

4.2.1. Lectura de antibiograma

Milián, G en el 2008 evaluó comportamiento de las cepas de *Bacillus subtilis* frente a los diferentes antibióticos encontrando que tres de las cepas (C-31, C-34 y E-44) eran sensibles a 25 antibióticos de uso humano y animal.

Hong en el 2004 evaluó cepas de *Bacillus subtilis* frente a Cloranfenicol, Novobiocin, Rifampicin, Tetraciclina, Streptomycin, Cefalosporina y Cycloserina y demostraron la resistencia marcada de estas cepas ante estos antibióticos (Milián, 2008)

Los resultados obtenidos al momento de realizar la lectura fueron la observación de tres cepas resistentes a penicilina **X2⁻¹⁰ (2)**, **X5⁻⁹ (2) C**, **X5⁻⁹ (2) CD** encontrándose dentro de estas tres una que se mostró resistente a Oxitetraciclina y Kanamicina **X2⁻¹⁰ (2)**, y la cuarta cepa **α ⁻⁸ (1)** se mostró sensible a todos los antibióticos como se muestra en las siguientes gráficas.

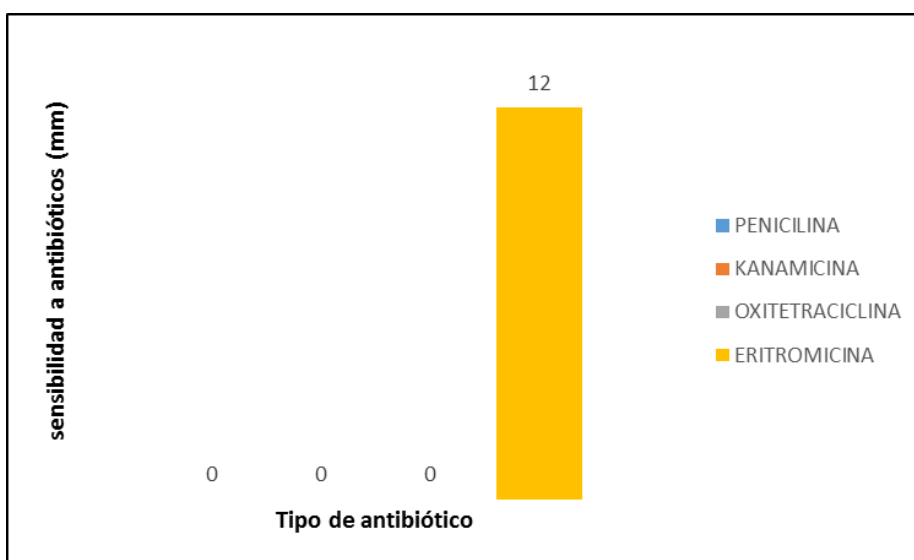


Figura 5. Sensibilidad frente a antibióticos de cepa **X5⁻⁹ (2) CD**

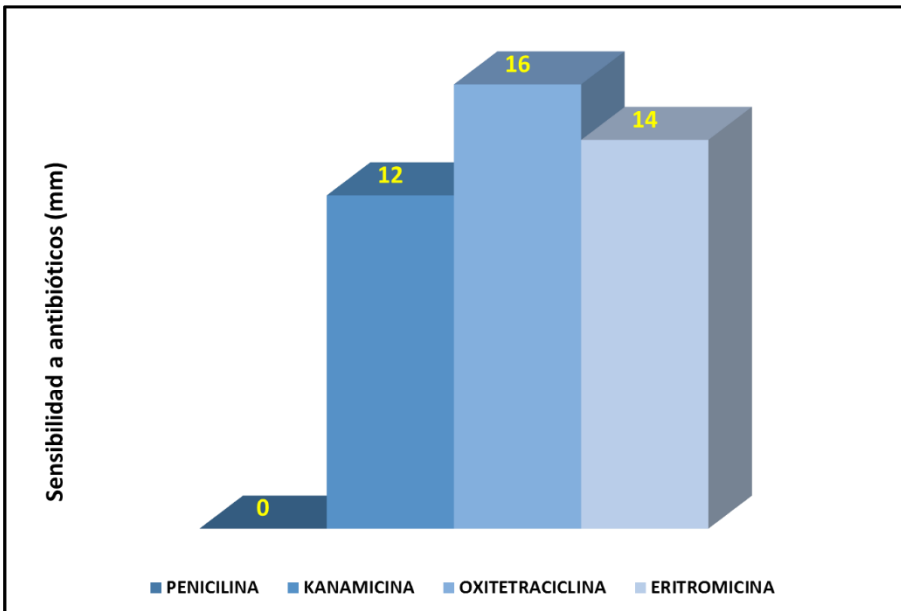


Figura 6. Sensibilidad frente a antibióticos de cepa X5⁻⁹ (2) C.

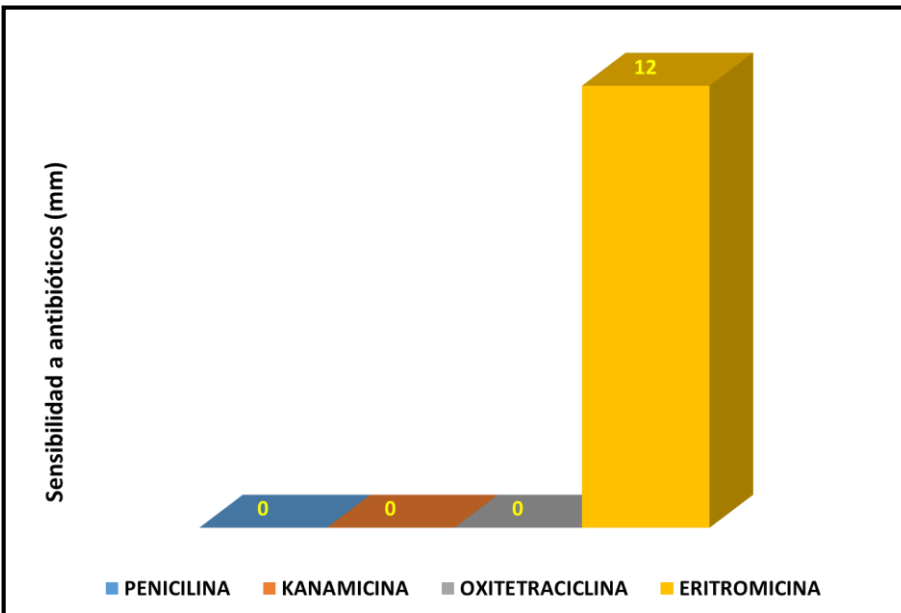


Figura 7. Sensibilidad frente a antibióticos de cepa X2⁻¹⁰ (2)

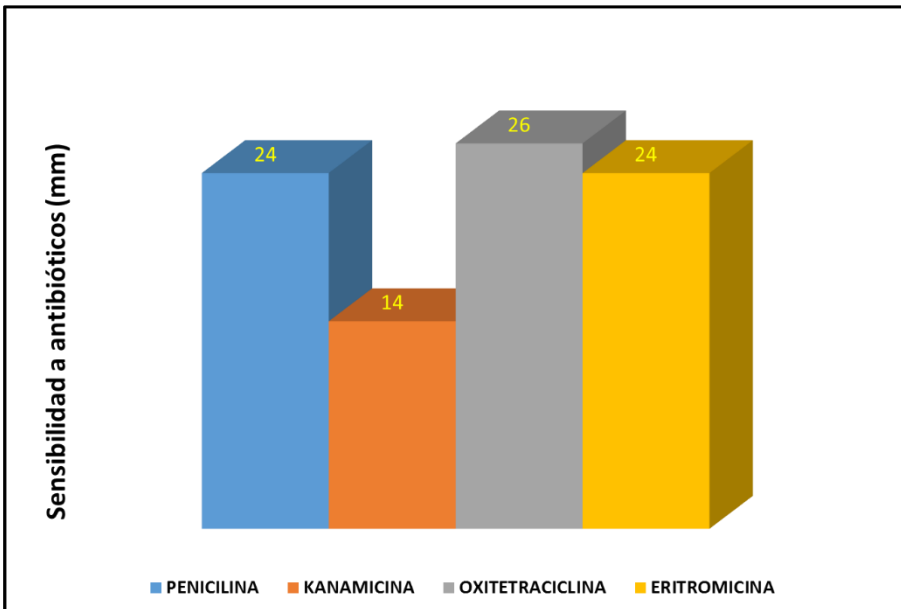


Figura 8. Sensibilidad frente a antibióticos de cepa α^8 (1).

4.3. Proteólisis de Caseína

Se observó crecimiento y utilización de la caseína de las cepas sembradas en el medio de agar caseína, por lo tanto, se tomó en cuenta que estos microorganismos aislados tienen actividad proteolítica, (ver anexo 34).

4.4. Pruebas probióticas

Fueron sometidas las cepas X5⁻⁹ (2)C, X5⁻⁹ (2)CD, X2⁻¹⁰ (2) y α^8 (1), a las cuales se les realizaron pruebas de Bilis esculina, tolerancia a la sal (NaCl 6.5 %) Ph Acido y proteólisis de caseína dando como resultado que las cepas con mejores actividades probióticas, incluyendo proteólisis de caseína correspondieron a las cepas X5⁻⁹ (2)CD, X5⁻⁹ (2)C, X2⁻¹⁰ (2) demostrado que estas son las que pueden soportar los cambios de pH, sales biliares y actividad enzimática presentes en el intestino de los animales .

4.4.1. Halos de hidrolisis de caseína y conteo de endosporas

Al realizar estas pruebas se determinó que la mejor cepa con actividad probiótica y enzimática identificada por microbiología convencional es la cepa X5⁻⁹ (2) C, que corresponde al *Bacillus subtilis*.

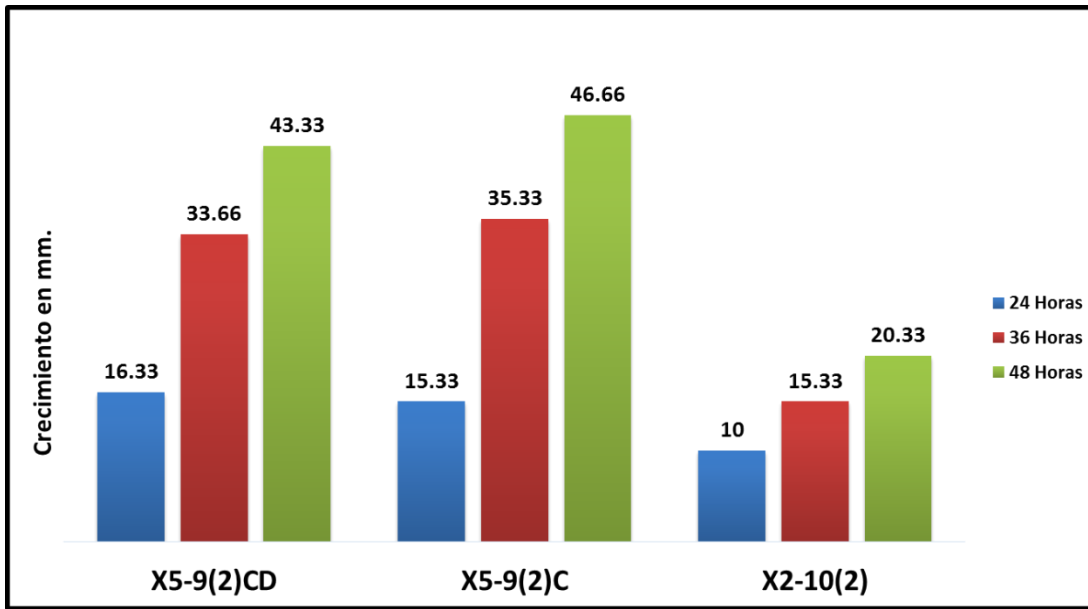


Figura 9. Lectura de formación de halos de hidrólisis

Para determinar la cantidad de microorganismo por ml en cada una de las diluciones y tener en consideración la actividad hidrolítica en el agar caseínas lo que permitirá evaluar las enzimas hidrolíticas, que ayudan a mejorar la utilización de los alimentos y las transforman en nutrientes más simples. Sólo las bacterias del género Bacillus (*B. thuringiensis* y *B. subtilis*) hidrolizan la caseína.

V. CONCLUSIÓN

Se aislaron cepas del género *Bacillus spp* las cuales fueron identificadas haciendo uso de pruebas bioquímicas, seleccionando aquellas con las características de *Bacillus subtilis*, a estas cepas se les realizaron pruebas para la identificación de actividad probiótica *in vitro* demostrando mediante los resultados que las mejores cepas con acción probiótica correspondieron a las muestras tomadas de los ciegos de pollo (línea Cobb) y concentrado de pollos “X5⁻⁹ (2)C, X5⁻⁹ (2)CD, X2⁻¹⁰ (2)”. La prueba probiótica final utilizada para la determinación de la mejor cepa con actividad probiótica fue la “formación halos de hidrólisis de caseína”, en donde los datos obtenidos de esta prueba fueron introducidos en el Software estadístico MINITAB 2014 dando como resultado que la cepa óptima con estas características fue la identificada con el código X5⁻⁹ (2)C.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar la secuenciación para confirmar el de cepa a la cual pertenece el *Bacillus spp.* aislado durante la investigación.
- Evaluar los parámetros cuantitativos en los animales de producción.
- Se recomienda evaluar a nivel de campo para determinar *in vivo* las propiedades que muestre al ser suministrado como aditivo en la alimentación de los animales en producción.
- Al obtener resultados positivos de las recomendaciones anteriores planteamos que debe ser producido a escala industrial de manera que se pueda ofertar al mercado nacional un producto que sea de calidad y cumpla con los estándares exigidos por el mercado internacional y de esta forma se disminuyan costos en la producción de nuestro país.

VII. LITERATURA CITADA

- Bailón, L.; González, R.; Cervantes, A. 2003. Atlas de pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias. (en línea). Zaragoza, MX. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultado el 15 de Oct. 2015. Pdf. Disponible en: <https://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/atlasmicrobiologia1.pdf>
- Baker, F. 1970. Manual de Técnica de Bacteriológica. 2ª. ed. Zaragoza, ES. Acribia. P37.
- Castañedo, J.; Moran, J.; Lara, L. 2002. Metodología de la Investigación. México D, F, MX. McGRAW-HILL. 277p.
- Castejón, E. 2008. Probióticos. (en línea). Barcelona, ES. Consultado el 12 de Jun del 2015. Pdf. Disponible en: <http://www.scpediatria.cat/primaria/wp-content/uploads/PROBIOTICOS.pdf>
- Collins, C.; Lyne, P. 1989. Métodos Microbiológicos. Zaragoza, ES. ACRIBIA. 524p.
- Cuervo, J. 2010. Aislamiento y caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. (en línea). Bogotá, CO. Pontificia Universidad Javeriana. Consultado el 28 de Sept. 2015. Pdf. Disponible en: <http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8434/1/tesis404.pdf>
- Drew, R. 2010. Productos el Sol. US. Thomas Scientific. 2010p.
- García, F. 2013. La Tesis y el Trabajo de Tesis: Recomendaciones metodológicas para la elaboración de los trabajos de tesis. México, MX. Limusa. 79p.
- Gonzales, R; Piad, R.; Gonzales, E. 2011. Sustitución de antibióticos promotores del crecimiento en la producción animal, por aditivos alternativos producidos en Nicaragua. (en línea). Managua, NI. Consultado el 15 de Oct. 2015. Pdf. Disponible en: http://redbiona.bligoo.com.co/media/users/9/452257/files/35338/Cap_tulo_CEBIOT_Version_final.pdf
- Haro, M; Ruiz, V; Guerra, F. 2012. Manual para la identificación de microorganismos de interés veterinario. México, MX. Trillas. 120p.
- Holt, J.; Krieg, N.; Sneath, P.; Stanley, J. 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (en línea). Consultado el 12 de ene. 2015. Pdf, disponible en: http://www.uiweb.uidaho.edu/micro_biology/250/IDFlowcharts.pdf
- INITER. 2012. Dirección general de Geodesia y Cartografía. (en línea). Managua, NI. Consultado el 12 de Ago. 2015. Disponible en: http://www.ineter.gob.ni/Geodecia/mapa_de_managua.html

Koneman.; Winn; Allen. 2006. Koneman: Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas a Color. (en línea). 6ª. ed. Buenos Aires, AR. Médica Panamericana. Consultado el 02 de ene. 2015. Libro, disponible en: <https://books.google.com.ni/books?id=jyVQueKro88C&printsec=frontcover&dq=koneman&hl=es&sa=X&sqi=2&ved=0CB0Q6AEwAGoVChMI97yqqM6xyAIVyFYeCh2Nyg-e#v=onepage&q=koneman&f=false>

Lara, C.; Burgos, A. 2014. Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. (en línea). Córdoba, ES. Universidad de Córdoba. Consultado el 23 Sept de 2015. Pdf. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/776/77624081004.pdf>

Mercado, H. 2008. ¿Cómo Hacer una Tesis?: Licenciatura, Maestría y Doctorado. 4ª. ed. México D F, MX. LIMUSA. 375 p.

Milián, G.; Pérez, M.; Bocourt, R. 2008. Obtención de cultivos de *Bacillus spp.* Y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos. (en línea). Matanzas, CU. Consultado el 24 de Sept. 2015. Pdf. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1930/193015494001.pdf>

Milián, G.; Pérez, M.; Puentes, Y.; Bocourt, R. 2004. Empleo de probióticos a base de *Bacillus sp* y sus endosporas en la producción avícola. (en línea). La Habana, CU. Instituto de Ciencia Animal. Consultado el 17 de octubre de 2015. Pdf. Disponible en: <http://monografias.umcc.cu/monos/2004/Agronomia/um04IA08.pdf>

Organización Mundial de Gastroenterología. 2008. Probióticos y prebióticos. (en línea). Consultado el 12 de Sept. 2015. Pdf. Disponible en: http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/1182/19_probioticos_prebioticos_es.pdf

PRONicaragua. 2015. Economía. (en línea). Managua, NI. Consultado el 15 de Oct. 2015. Pdf. Disponible en: <http://www.pronicaragua.org/es/descubre-nicaragua/economia>

Realpe, M.; Hernández, C.; Agudelo, C. 2002. Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. (en línea). Bogotá, CO. Consultado el 23 de Sept. 2015. Pdf. Disponible en: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/viewFile/1148/126>

Rodríguez, J. 2011. Aislamiento e Identificación de Microorganismos con Presuntivo Potencial Probiótico a Partir de Heces de Animales de Producción Industrial. (en línea). Bogotá, CO. Pontificia Universidad Javeriana. consultado el 10 de septiembre del 2015. Pdf, disponible en: <http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8819/1/tesis767.pdf>

Tamayo, M. 2005. Metodología Formal de la Investigación Científica. México, D, F, MX. LIMUSA. 159p

UNA (Universidad Nacional Agraria, NI). 2008. Guías y normas metodológicas de las formas de culminación de estudios. Managua, NI. 56p.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Lectura de pruebas de catalasa

Nº	Cepa	Catalasa
1	X4 ⁻⁹ (2)	CATALASA POSITIVA
2	X2 ⁻¹⁰ (2)	CATALASA POSITIVA
3	Y1 ⁻⁸ (2)C	CATALASA POSITIVA (RAPIDA)
4	Y1 ⁻⁹ (1)	CATALASA POSITIVA (RAPIDA)
5	X5 ⁻⁸ (1)	CATALASA POSITIVA
6	X5 ⁻⁹ (2) CD	CATALASA POSITIVA
7	X9 ⁻⁹ (2)	CATALASA POSITIVA (LENTA)
8	X5 ⁻⁸ (1)	CATALASA POSITIVA
9	X2 ⁻¹⁰ (2)	CATALASA POSITIVA (LENTA)
10	X5 ⁻⁹ (2) C	CATALASA POSITIVA
11	E ⁻¹⁰ (2)	CATALAS POSITIVA
12	SC ⁻¹⁰ (1)	CATALASA NEGATIVO
13	SC ⁻⁹ ½	CATALASA POSITIVO
14	8 ⁻⁹ (2)	CATALAS POSITIVO
15	3 ⁻¹⁰ (2)	CATALAS POSITIVO
16	8 ⁻⁹ (2)	CATALASA POSITIVA (RAPIDA)
17	3 ⁻¹⁰ (2)	CATALASA POSITIVA (RAPIDA)
18	VIII ⁻¹⁰ (1)	CATALASA POSITIVA
19	VIII ⁻¹⁰ (1)D	CATALASA POSITIVA
20	VI ⁻⁸ (1)	CATALASA POSITIVA
21	VII ⁻⁹ (1)	CATALASA POSITIVA
22	VIII ⁻¹⁰ (2)	CATALASA POSITIVA
23	5 ⁻⁹ (1)	CATALSA POSITIVA (LENTA)
24	VIII ⁻¹⁰ (1)	CATALASA POSITIVA
25	5 ⁻¹⁰ (2)	CATALSA POSITIVA (LENTA)
26	α ⁻⁸ (1)	CATALASA POSITIVA

Anexo 2. Conteo de células en cámara de Neubauer

CEPAS ORIGINALES											
		$X_2^{-10} (Z)$			$X_5^{-9} C$			$X_5^{-9} CD$			
CUADRANTE	X_2	X_2^{-1}	X_2^{-2}	$X_5 C$	$X_5^{-1} C$	$X_5^{-2} C$	$X_5 CD$	$X_5^{-1} CD$	$X_5^{-2} CD$		
1	301	62	7	136	16	2	102	10	1		
2	339	50	4	127	20	3	101	9	3		
3	315	53	13	111	10	3	92	11	3		
4	297	52	4	96	10	3	100	9	4		
5	362	52	10	96	11	2	96	14	1		
Promedio	322.8	53.8	7.6	113.2	13.4	2.6	98.2	10.6	2.4		
Dividido entre 4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
	80.7	13.45	1.9	28.3	3.35	0.65	24.55	2.65	0.6		
Dividir por 0.000006	0.000006	0.000006	0.000006	0.000006	0.000006	0.000006	0.000006	0.000006	0.000006		
	13450000	2241666.67	316666.66	4716666.6	558333.33	108333.33	4091666.6	441666.667	100000		
			7	7	3		7				
Multiplicar por cada exponente de la cepa		0.1	0.01		0.1	0.01		0.1	0.01		
Células/ml	13450000	224166.667	3166.6666	4716666.6	55833.333	1083.3333	4091666.6	44166.6667	1000		
			7	7	3		7				

Anexo 3. Preparación de cristalería



Anexo 7. Baño maría



Anexo 4. Preparación de materiales



Anexo 8. Ceba aislada de shock térmico



Anexo 5. Preparación de desinfectantes



Anexo 9. Ceba aislada de shock térmico



Anexo 6. Extracción de ciegos de pollo



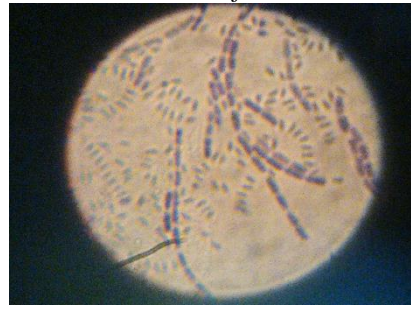
Anexo 10. Reactivo para tinción de Gram



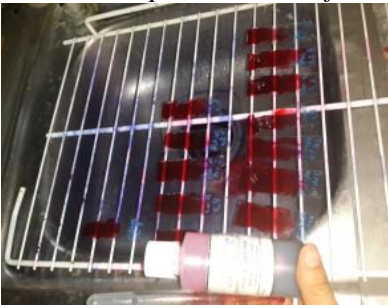
Anexo 11. *Aplicación de Lugol a frotis*



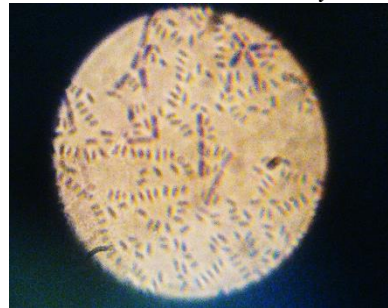
Anexo 15. *Bacilos formando cadenas*



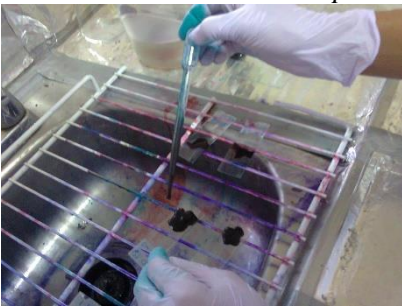
Anexo 12. *Aplicación de safranina a frotis*



Anexo 16. *Bacilos unicos y multiples*



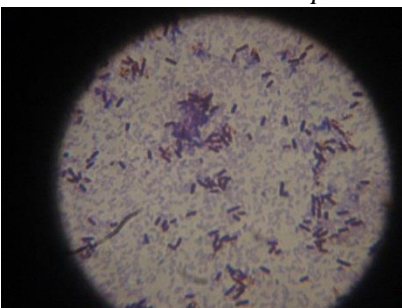
Anexo 13. *Tinción de endosporas*



Anexo 17. *Reacción a prueba de catalasa*



Anexo 14. *Bacillus Gram positivo*



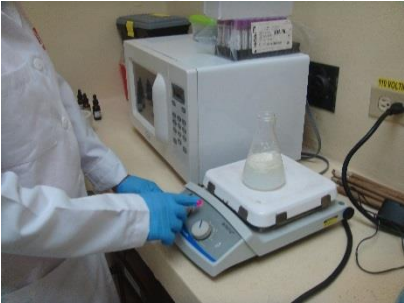
Anexo 18. *Medios de cultivo utilizados*



Anexo 19. *Preparación de medios*



Anexo 20. *Preparación de agar leche*



Anexo 21. *Esterilización de medios*



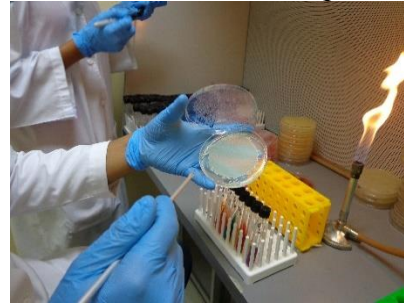
Anexo 22. *Conservación de cepas en caldo leche*



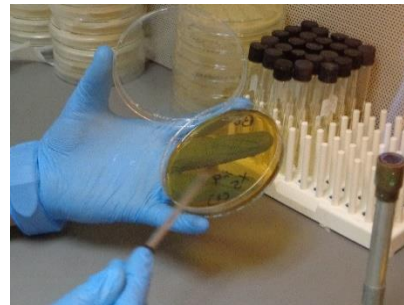
Anexo 23. *Conservación de medios para siembra*



Anexo 24. *Siembra de bioquímica*



Anexo 25. *Siembra en Bilis Esculina*



Anexo 26. *Bioquímica en incubadora*



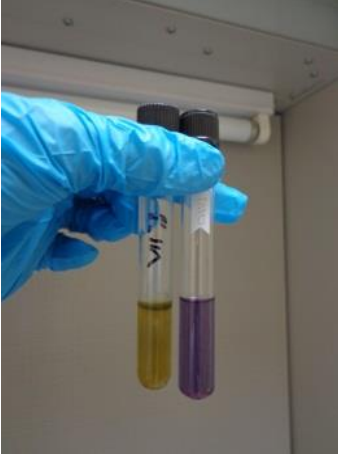
Anexo 27. *Reacción a prueba Bioquímica*



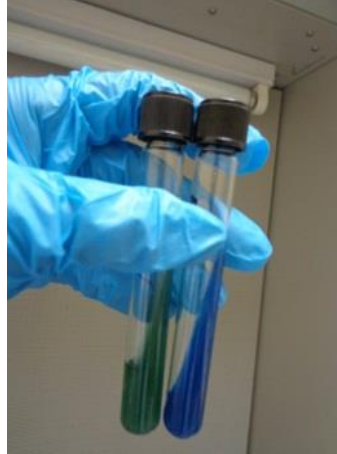
Anexo 29. *Reacción a TSI*



Anexo 28. *Reacción de MIO*



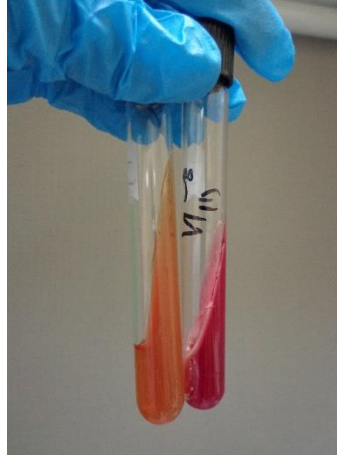
Anexo 30. *Reacción de Citrato*



Anexo 28. *Reacción de SIM*



Anexo 31. *Reacción de TSI*



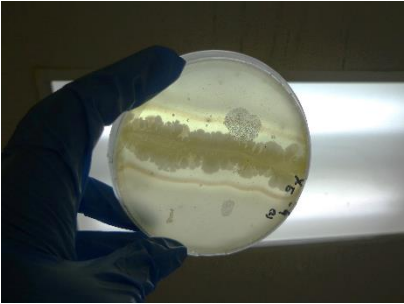
Anexo 32. *Sensibilidad a antibióticos*



Anexo 35. *Siembra para pruebas de hidrólisis de caseína*



Anexo 33. *Proteólisis de Caseína*



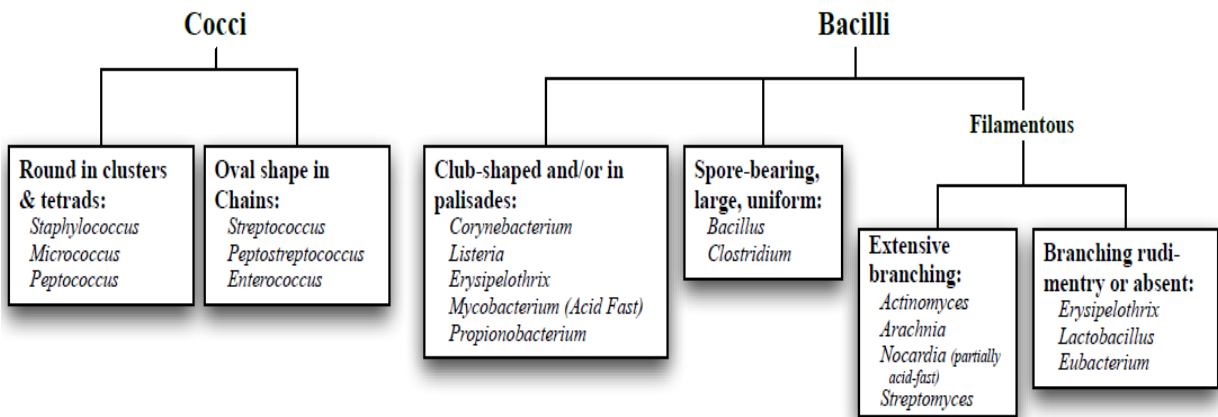
Anexo 36. *Halos de hidrólisis de caseína*



Anexo 34. *Crecimiento en Bilis Esculina*



Anexo 37. Selección de bacterias Gram positivas (Manual Bergy's)



Anexo 38. Flujograma de pruebas bioquímicas del bacilo y de pruebas probióticas (Manual Bergy's)

