



**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGROPECUARIO**

TEMA:

**EFFECTOS DEL USO DE *Bacillus subtilis* EN AGUA DE BEBIDA EN POLLOS
DE ENGORDE SOBRE PARÁMETROS SANITARIOS EN EL AÑO 2019-2020.**

AUTOR:

PEDRO RAMÓN ALCÍVAR ZAMBRANO

TUTOR:

DR. RAMÓN MOLINA BASURTO, Mg.

MANTA- MANABÍ- ECUADOR

2020

**LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR APRUEBAN EL
INFORME DEL TRABAJO DE GRADO SOBRE EL TEMA:**

Efectos del uso de *Bacillus subtilis* en el agua de bebida para pollos de engorde sobre aspectos sanitarios en el año 2019-2020 del egresado Alcívar Zambrano Pedro Ramón, luego de haber sido analizada por los señores Miembros del Tribunal de Grado, en cumplimiento de lo que establece la ley se da por aprobada la sustentación, acción que le hace acreedores al título de Ingeniero Agropecuario.

Manta, mayo del 2020

Miembros del Tribunal Calificador:

Dr. Exequiel Cárdenas Reyes

Ing. Horley Cañarte García

Ing. Churchill Aveiga Villacis

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Dr. Ramón Molina Basurto Certifica haber tutorado la tesis “**Efectos del uso de *Bacillus subtilis* en el agua de bebida para pollos de engorde sobre aspectos sanitarios en el año 2019-2020**” que ha sido desarrollada por Pedro Ramón Alcívar Zambrano egresado de la carrera de Ingeniería Agropecuaria, previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario, de acuerdo al reglamento para la elaboración de la tesis de grado del tercer nivel, de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí.

Dr. Ramón Molina Basurto

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Pedro Ramón Alcívar Zambrano declaro bajo juramento la responsabilidad de los hechos, ideas y doctrinas expuestos en la presente tesis corresponde exclusivamente al patrimonio intelectual de los autores, estudiantes de la carrera de Ingeniería Agropecuaria de la Facultad Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí.

Pedro Ramón Alcívar Zambrano

CI: 092417243-0



AGRADECIMIENTO

Principalmente agradezco a Dios, por darme la oportunidad de vivir y por bendecirme en los momentos más duros de mi vida para lograr esta meta.

Agradezco todo el apoyo continuo que he recibido de mis tutores y docentes que me han formado durante estos años de estudios. Además de forma especial, quiero agradecer con admiración a:

Mi tutor Ramón Molina Basurto, por su constante guía y apoyo a lo largo de la carrera.

Al Ingeniero Churchill Aveiga Villacis, por haberme invitado a formar parte de esta importante investigación y por todos sus conocimientos y saberes brindados.

Al Ingeniero Carmelo Menéndez, por haberme instruido, con paciencia y dedicación teniéndome fé, motivándome siempre a pesar de los obstáculos para graduarme.

Sin poder olvidar a la Dra. Fátima García, quien fué clave desde mi educación primaria.

A la dedicación presentada por los docentes miembros del tribunal examinador de este trabajo de titulación; Dr. Exequiel Cárdenas, Ing. Horley Cañarte e Ing. Churchill Aveiga.



DEDICATORIA

Este trabajo de ardua dedicación, constancia, perseverancia y esmero, del cual no se consigue con el amanecer de un solo día, sino más bien con muchos años de trabajo.

Al cumplir esta importante meta en mi vida, donde mi esfuerzo se ve reflejado, en este documento de titulación, y de forma muy especial quiero dedicarlo a:

Mi madre de forma muy especial, Zambrano Gómez Sonia María, por haberme dado la vida y una buena educación aconsejándome siempre para seguir adelante, además de su constante apoyo moral, incentivándome a la continuación de mis estudios. A mi padre Alcívar Demera Pedro Ricardo también por haberme dado la vida y haberme enseñado a vivirla. A mis hermanas en especial, a Alcívar Zambrano María Fernanda, Sonia María Alcívar Zambrano y María Daniela Alcívar Zambrano por haberme apoyado incondicionalmente a través de todo este tiempo la cual luché y no me di por vencido.

A mi esposa Valeska Naomi Cobeña Pico quien me ha acompañado y a mi hermosa hija Sol Emilia Alcívar Cobeña, una bendición de Dios.

Les dedico este logro a toda mi familia, allegados, docentes, tutores y amigos.

<u>Los miembros del tribunal examinador aprueban el informe del trabajo de grado.....</u>	II
<u>Certificación del tutor.....</u>	III
<u>Declaración de autoría.....</u>	IV
<u>Agradecimiento.....</u>	V
<u>Dedicatoria.....</u>	VI

Índice de Contenido

<u>Resumen.....</u>	1
<u>Summary.....</u>	2
1. <u>Introducción.....</u>	3
2. <u>Problema.....</u>	4
3. <u>Objetivos.....</u>	5
3.1 <u>Objetivo General.....</u>	5
3.2 <u>Objetivos Específicos.....</u>	5
4. <u>Periodo.....</u>	5
5. <u>Justificación.....</u>	6
6. <u>Marco Teórico.....</u>	8
6.1 <u>Los probióticos.....</u>	8
6.2 <u>Bacillus Subtilis.....</u>	8
6.2.1 <u>Taxonomía.....</u>	9
6.3 <u>Mecanismos de acción de los probióticos.....</u>	9
6.3.1 <u>Bacillus subtilis en la reducción de bacterias nocivas.....</u>	9
6.3.2 <u>Bacillus subtilis y la capacidad antioxidante.....</u>	9
6.3.3 <u>Bacillus subtilis y los beneficios para el medio ambiente.....</u>	10
6.3.4 <u>Bacillus subtilis en el estímulo de la inmunidad.....</u>	10
6.4 <u>Aspectos Sanitarios.....</u>	10
6.4.1 <u>Salmonella.....</u>	10
6.4.2 <u>Escherichia. coli.....</u>	12
6.4.3 <u>Parásitos intestinales.....</u>	12
6.4.4 <u>Infecciones respiratorias.....</u>	14
6.4.5 <u>Definición de Cultivo y Antibiograma.....</u>	15
¿Por qué hacer el análisis de Antibiograma?.....	15
¿Qué es lo que se analiza en el antibiograma?.....	15
¿Cuándo se solicita en el antibiograma?.....	16
¿Qué significa el resultado del antibiograma?.....	16
6.5 <u>Hipótesis.....</u>	16
6.6 <u>Variables.....</u>	16
7. <u>Metodología.....</u>	17
7.1 <u>Ubicación del estudio.....</u>	17
7.2 <u>Tipo de Diseño Experimental.....</u>	17
7.3 <u>Diseño Experimental.....</u>	17
7.4 <u>Cepa de Bacillus subtilis.....</u>	18
7.5 <u>Medio de cultivo a base de caldo nutritivo.....</u>	18
7.6 <u>Manejo de experimento.....</u>	19
7.7 <u>Materiales.....</u>	20
7.8 <u>Análisis de Resultados.....</u>	20
8. <u>Resultados.....</u>	21
8.1 <u>Conteo de colonias.....</u>	21

8.2 Formulas.....	24
8.3 <u>Resultado de antibiograma</u>	25
8.4 <u>Nomenclatura</u>	26
8.5 <u>Mediciones de microvellosidades</u>	29
8.6 <u>Medición de grietas</u>	38
9. <u>Conclusión</u>	39
10. <u>Recomendaciones</u>	40
11. <u>Anexos</u>	41
12. <u>Bibliografías</u>	47

Índice de tabla.

Tabla 1. Conteo de colonias para <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> día 14.....	21
Tabla 2. Conteo de colonias para <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> día 42.....	21
Tabla 3. Conteo e identificación de bacterias en el tracto respiratorio.....	23
Tabla 4. Resultados Coproparasitarios etapa 1.....	24
Tabla 5. Resultados Coproparasitarios etapa 3.....	24
Tabla 6. Resultados de Antibiograma en aves día 14.....	25
Tabla 7. Resultados de Antibiograma en aves día 42.....	25
Tabla 8. Medición de microvellosidades	26

Índice de gráficos.

Gráfico 1. Conteo de colonias para <i>Salmonella</i> desde el día 14 al 42.....	22
Gráfico 2. Conteo de colonias para <i>E. coli</i> desde el día 14 al 42.....	22
Gráfico 3. Conteo de colonias bacterianas en el tracto respiratorio.....	23
Gráfico 4. Crecimiento de microvellosidades T0.....	27
Gráfico 5. Crecimiento de microvellosidades T1.....	27
Gráfico 6. Crecimiento de microvellosidades T2.....	28
Gráfico 7. Crecimiento de microvellosidades T3.....	28

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la ULEAM Manta. Los pollos fueron criados en la parroquia Convento del cantón Chone provincia de Manabí, durante el año 2019, 2020. El estudio consistió en ver los efectos del uso de *Bacillus subtilis* en agua de bebida como probióticos sobre aspectos sanitarios en pollos de engorde.

Se crió 120 pollos. Sin vitaminas, antibióticos o cualquier otro suplemento más que *Bacillus subtilis* como probiótico, las dosis aplicadas en el agua de bebida fueron de 10^6 , 10^8 , 10^{10} UFC en tres diferentes tratamientos quedando uno como testigo.

Los pollos se trasladaban vivos para sacrificarlos en el laboratorio.

Se sacrificó nueve pollos en total, uno el día 0, cuatro el día 14 y cuatro el día 42 para tomar muestras de ciego, muestras coprológicas y para tracto respiratorio.

Se realizó diluciones, siembras, antibiograma y conteos de cada tratamiento para *Salmonella* y *E. coli*.

Se realizó Cortes Histológicos, una porción plana y otra redonda en todos sus tratamientos y etapas.

Se realizó mediciones de las microvellosidades y grietas del duodeno, yeyuno e íleon de todos sus tratamientos y etapas.

Para determinar los efectos del uso de *Bacillus subtilis* en el agua de bebida en pollos de engorde sobre parámetros sanitarios.

SUMMARY

The present investigation was carried out in the laboratories of Faculty of Agricultural Science of the Uleam Manta. The chickens were raised in Convento the canton Chone province of Manabi, During the years 2019-2020. This study consisted of seeing the effects of the use of *B. subtilis* in drinking water as probiotics on health aspects in broilers.

120 chickens were raised without vitamins, antibiotics or any other supplement other than *B. subtilis* as probiotics, the doses applied in the drinking water were 10^6 10^8 10^{10} in three treatments, leaving one as a control.

Chickens were moved alive for slaughter in the laboratory.

A total of nine chickens were sacrificed, one on day 0, four on day 14 and four on day 42 to take cecum samples, stool samples in for the respiratory tract.

Dilutions, sowing, antibiogram in counting of each treatment for *Salmonella* and *E. coli* were performed.

Histological Sections were made, a flat portion and a round portion in all its treatments and stages.

Measurements were made of the microvilli and cracks of the duodenum, jejunum and ilium of all its treatments and stages.

1. Introducción

Como sabemos los antibióticos son medicamentos que actúan contra los organismos vivos. Estos medicamentos destruyen las bacterias, sin diferenciar si son buenas o malas para el organismo.

La flora microbiana o microbiota es la responsable de garantizar nuestra salud, en mayor presencia que nuestras células. Esta recubre las mucosas protegiéndolas, ya sean respiratorias, digestivas o urogenitales.

Cuando ingerimos medicamentos antibióticos, alteramos la flora microbiana, disminuyendo las defensas contra enfermedades infecciosas asegurando recaídas futuras. La microbiota principalmente actúa en la inmunidad y en los procesos digestivos cuando hay intercambio simbiótico.

El mal uso de estos medicamentos en animales de explotación posiblemente provoque que las bacterias generen resistencia a los mismos, por lo tanto, dejan de ser aptos para el consumo humano. Las características del *Bacillus subtilis* se analizaron para uso de probióticos, encontrado comúnmente en diferentes ambientes. Los probióticos son una considerable alternativa contra el uso de antibióticos como promotores del crecimiento. El *B. subtilis* como probióticos representa la mejora de parámetros productivos y condiciones sanitarias de las aves beneficiando también al medio ambiente. Otra característica muy importante es la estabilidad de la microbiota al disminuir la presencia de *E. coli*, *Salmonelas* y coccidias, favoreciendo un aumento de microorganismos benéficos para el incremento de inmunoglobulinas IgA e IgG. Recientes investigaciones han demostrado que el *B. subtilis* contribuye a la disminución de niveles de amoníaco en excretas, producción de sustancias antioxidantes y el aumento de la digestibilidad como consecuencia del equilibrio intestinal de las aves. Además, se ha encontrado que las xilanasas que producen los *B. subtilis* tienen un efecto similar a los antibióticos en intestino delgado. (Abanico vet vol.7 no.3 Tepic sep./dic. 2017)

2. Problema.

Como sabemos los antibióticos son medicamentos que actúan contra los organismos vivos. Estos medicamentos destruyen las bacterias, sin diferenciar si son buenas o malas para el organismo.

La flora microbiana o microbiota es la responsable de garantizar nuestra salud, en mayor presencia que nuestras células. Esta recubre las mucosas protegiéndolas, ya sean respiratorias, digestivas o urogenitales.

Cuando ingerimos medicamentos antibióticos, alteramos la flora microbiana, disminuyendo las defensas contra enfermedades infecciosas asegurando recaídas futuras. La microbiota principalmente actúa en la inmunidad y en los procesos digestivos cuando hay intercambio simbiótico.

El mal uso de estos medicamentos en animales de explotación posiblemente provoque que las bacterias generen resistencia a los mismos, por lo tanto, dejan de ser aptos para el consumo humano. Considerado como una de las futuras grandes epidemias que afrontará el ser humano, También así aseguró el director del CDC (Centers for Disease Control and Prevention Director) Centro de Control y Prevención de Enfermedades por Tom Frieden. Dos millones de personas contraen cada año infecciones resistentes a los antibióticos en Estados Unidos, y no es mucho mejor en España asegura (Barnés. 2014)

En España, aproximadamente 2.500 personas mueren cada año a causa de microbios súper resistentes que generan un gasto sanitario aproximado de 150 millones de euros al año, según datos del Ministerio de Sanidad. Se estipula que por cada año morirían 10 millones de personas, según William Hall. Hall es uno de los autores de un informe científico sobre la resistencia a los antibióticos que ha puesto en alerta a las autoridades europeas. El documento sostiene que si no se toman medidas urgentes en 2050 morirán más personas por superbacterias, que por otras enfermedades como cáncer (8,2 millones de muertes) o por accidentes de tráfico (1,2 millones). Según (Manuel Ansede, 2016).

3. Objetivos

3.1 Objetivo General.

Evaluar el efecto del *Bacillus subtilis* en los parámetros sanitarios sobre las diferentes concentraciones en el agua de bebida para pollos de engorde.

3.2 Objetivos específicos.

- Tomar muestra de ciego para *Salmonella* y *E. coli*
- Extraer muestra de ciego para detectar parásitos intestinales
- Adquirir hisopado de mucosa nasal para analizar infecciones respiratorias
- Estudiar Cultivo y Antibiograma
- Medición de microvellosidades mediante cortes histológicos

4. Periodo

Se realizó en los últimos meses del 2019 hasta enero de 2020 alrededor de 6 semanas de duración del proceso de crianza más experimentación en laboratorio.

5. Justificación.

Los probióticos son microorganismos vivos o bacterias beneficiosas adicionadas como alimentos en bebida que permanecen activos en el intestino, suficientes para cambiar y alterar la microbiota intestinal del huésped, tanto por implantación como por colonización. Podrían recuperarse vivos en las excretas ya que pueden atravesar el aparato digestivo, pero también se adhieren a la mucosa intestinal.

En el año 2002, La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió a los probióticos como Microorganismos vivos que, cuando son aplicados en cantidades adecuadas desarrollan beneficios en la salud del organismo anfitrión.

Estos Alimentos Funcionales presumen un aumento considerado en los ingresos de los productores, los cuales confirman que tienen propiedades beneficiosas. Actualmente, extraordinarias declaraciones no están respaldadas por pruebas científicas por ende los reguladores de Europa piden que se aporten, por el cual esta investigación.

Los probióticos son considerados seguros. (Wikipedia. 2017)

La *Klebsiella pneumoniae*, es una cepa de bacteria muy resistente con una letalidad por encima del 50%, similar al brote del ébola, Según la médica Pilar Ramón, asesora de la (OMS) Organización Mundial de la Salud.

El origen del problema no son los microbios, sino el mal manejo por parte de personas como médicos, veterinarios, farmacéuticos, ganaderos, pacientes. Etc. Por (Manuel Ansedo, 2016)

Trabajaremos con el *Bacillus subtilis* una bacteria encontrada en el suelo. Es una bacteria Gram positiva, Catalasa-positiva, aerobio. Miembro del Género *Bacillus*, esta tiene la habilidad de formar una resistente endospora protectora, que le permite vivir en condiciones extremas. (Wikipedia. 2017)

Desde 1986. Se ha utilizado el *Bacillus subtilis* como probiótico para mejorar el rendimiento en pollos de engorde tanto aspectos productivos y sanitarios. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) European Food Safety Authority. Elaboraron un documento científico sobre seguridad y eficacia del *B. subtilis* como aditivo para pollos de engorde con un contenido mínimo de 1×10^7 , y uno máximo de 5×10^7 UFC/kg en dieta completa. El *B. subtilis*; es una especie con evaluación, (QPS) Qualified Presumption of Safety. Presunción Calificada de Seguridad. Por la EFSA es considerado aditivo seguro para aves, por la sensibilidad a antibióticos y la ausencia de potencial toxigénico, responsable con el consumidor y para el medio ambiente (González 2009).

Las características del *Bacillus subtilis* se analizaron para uso de probióticos, encontrado comúnmente en diferentes ambientes. Los probióticos son una considerable alternativa contra el uso de antibióticos como promotores del crecimiento. El *B. subtilis* como probióticos representa la mejora de parámetros productivos y condiciones sanitarias de las aves beneficiando también al medio ambiente. Otra característica muy importante es la estabilidad de la microbiota al disminuir la presencia de *E. coli*, *Salmonelas* y coccidias, favoreciendo un aumento de microorganismos benéficos para el incremento de inmunoglobulinas IgA e IgG. Recientes investigaciones han demostrado que el *B. subtilis* contribuye a la disminución de niveles de amoníaco en excretas, producción de sustancias antioxidantes y el aumento de la digestibilidad como consecuencia del equilibrio intestinal de las aves. Además, se ha encontrado que las xilanasas que producen los *B. subtilis* tienen un efecto similar a los antibióticos en intestino delgado. (Abanico vet vol.7 no.3 Tepic sep./dic. 2017)

Según (Elvis Alexander Díaz-López. 2017) La ventaja del probiótico es que no dejan residuos en el huevo ni en la carne del ave, y no generan riesgo de resistencia antibiótica en la microbiota humana.

6. Marco Teórico

6.1 Probióticos.

Desde 1965, se ha usado el término probióticos para describir a un organismo que interviene en el balance de la microflora intestinal; en los últimos años se lo ha considerado como suplemento alimenticio microbiano vivo, y los alimentos que los contienen se consideran funcionales para el anfitrión. (Gibson y Roberfroid, 1995). Principalmente las bacterias y levaduras se han utilizado como fuentes benéficas para mantener una microbiota digestiva sana y equilibrada. Para Grethel et. al., (2008) los microorganismos más usados son *Lactobacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Streptococcus faecium* y *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, el género *Bacillus* se destaca como probiótico, por la acción de las enzimas hidrofílicas extracelulares que actúan sobre polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos; siendo estos utilizados como fuentes de carbono, donadores de electrones y productores de antibióticos según (Forte et al., 2016; Manafi et al., 2016).

En la misión de mantener la microbiología intestinal en equilibrio, los probióticos nos garantizan una mejora en la producción y calidad del ave. Mejorando el ecosistema intestinal, mediante una rápida colonización de tracto intestinal para desplazar a los microorganismos patógenos nocivos, y así favorecer el desarrollo de otras bacterias benéficas productoras de ácido láctico. Las enzimas hidrolíticas favorecen la digestión de los alimentos, y la producción de inmunoglobulinas mejora la salud de las aves, como consecuencia se obtiene un mejor rendimiento productivo y sanitario aseguera (Abanico vet vol.7 no.3 Tepic sep./dic. 2017)

6.2 Bacillus Subtilis.

Es una bacteria Gram positiva, Comúnmente se encuentra en el suelo. Catalasa-positiva, aerobio. Miembro del Género Bacillus, El *B. subtilis* tiene la habilidad de formar una resistente membrana protectora llamada endospora, permitiendo al organismo soportar condiciones ambientales extremas. Crecen entre los 10 - 48°, la temperatura óptima es entre 28 - 35°.

6.2.1 Taxonomía.

Dominio:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Bacillaceae
Género:	Bacillus
Especie:	<i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg 1835)

6.3 Mecanismos de acción de los probióticos

La microbiota intestinal cuenta con un equilibrio muy importante, característica relevante por el *B. subtilis*, es de disminuir la presencia de patógenos nocivos como *E. coli*, *Salmonelas* y coccidias. Actuales investigaciones han comprobado que el *B. subtilis* ayuda en la disminución notable de niveles de amoníaco en las excretas, producción de sustancias antioxidantes y una mejora de la digestibilidad como consecuencia de un equilibrio intestinal en las aves de corral o explotación para consumo humano. Además, las xilanasas que producen los *B. subtilis* tienen un efecto parecido a los antibióticos en el intestino delgado. Conocer al *B. subtilis* como probióticos representa una mejora considerable en los parámetros productivos y sanitarios de las aves afirma (Medina et al 2017)

6.3.1 *Bacillus subtilis* en la reducción de bacterias nocivas

(Forte et al 2016) Por otra parte encontraron que mediante el uso de *Lactobacillus acidophilus* y *B. subtilis* como probióticos, se disminuye la presencia de *E. coli*, estafilococos y clostridios; al mismo tiempo que se va incrementando la presencia de bacterias beneficiosas, como *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.*

6.3.2 *Bacillus subtilis* y la capacidad antioxidante.

Se sabe que el *Bacillus subtilis* promueve el crecimiento y calidad de la carne de pollos de engorde por su capacidad antioxidante. Por su parte Bai et al., (2016) reportó un incremento de concentraciones en suero e hígado de sustancias antioxidantes como el glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, y un incremento de las concentraciones séricas de IgA e IgG importantes en la inmunidad de las aves.

6.3.3 *Bacillus subtilis* y los beneficios para el medio ambiente

El amoniaco proveniente del estiércol representa un verdadero problema ambiental, además de afectar también la salud de los animales y trabajadores encargados del manejo. Se ha visto que con la aplicación del *B. subtilis* en la alimentación, influye positivamente en el ecosistema de la microflora intestinal; Reduciendo los niveles de amoniaco en aves de corral, mediante la mejora de la actividad de enzimas y la utilización de nitrógeno según (Zhang *et al.*, 2014). Por otro lado, (Sharma *et al.* 2016) concuerda y además realizó mediciones mediante la técnica de espectrometría de masas, encontró que una dieta con la aplicación de *B. subtilis* como probióticos y mezclada con *yuca/Quillaja*, fue eficaz en la reducción de sustancias olorosas provenientes del estiércol en pollos de engorde.

6.3.4 *Bacillus subtilis* en el estímulo de la inmunidad.

Mencionan (Pozo *et al.*,1998; Lee *et al.*, 2011) que encontrando niveles elevados de (ON) óxido nitroso; el cual actúa como un mensajero intercelular que regula el tono vascular, la activación de las plaquetas y las respuestas inmunes como neurotransmisores en el sistema nervioso central; es una molécula citotóxica (cualidad de algunas células para ser tóxicas frente a otras que están alteradas.) implica la eliminación de bacterias, virus y protozoos, así como de células tumorales.

Una correcta alimentación en pollos de engorde con *B. subtilis* reduce la infección por *Eimeria maxima*. Adicionalmente. Además, se han comprobado las propiedades inmunomoduladoras de *B. subtilis* en la coccidiosis aviar, al reducir los signos clínicos de la enfermedad afirma (Kyung-Woo *et al.*,2010).

6.4 Aspectos Sanitarios.

- Muestra de ciego para *Salmonella* y *E. coli*
- Muestra de ciego para parásitos intestinales
- Hisopado de mucosa nasal para infecciones respiratorias
- Cultivo y Antibiograma

6.4.1 Salmonelosis Aviar.

Existen cepas de esta bacteria entre las más importantes; *Salmonella enteritidis* (SE) y *Salmonella typhimurium* (ST), *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum* (declaración obligatoria)

La *Salmonella pullorum* causa pulorosis (enfermedad sistémica que afecta a animales jóvenes menores de 3 semanas) y *Salmonella typhimurium* produce tifosis (enfermedad septicémica que afecta a animales de mayor edad).

(SAG. 2016) menciona que la infección de esta enfermedad puede ocurrir en una amplia variedad de hospederos incluyendo animales silvestres, domésticos y el ser humano incluso ocasionando una enfermedad clínica en aves muy jóvenes.

a) Patogenicidad

De tres tipos de toxinas depende la patogenicidad en las aves: Endotoxinas que producen fiebre en las aves; y dos enterotoxinas, una que causa una respuesta secretora celular en el lumen intestinal y una toxina que causa daño estructural a la mucosa celular intestinal.

La infección ha sido establecida por; vía oral, intra cloacal, intra traqueal, nasal, ocular y por aerosoles. Las aves infectadas pueden tener una persistente diseminación de la bacteria por las heces, dada la colonización intestinal, facilitando la transmisión horizontal. La diseminación sistémica multiplica la bacteria en hígado, bazo, ovario, oviducto, sangre, corazón, testículos, saco vitelino y peritoneo, entre otros órganos según (SAG. 2016)

b) Transmisión

La *Salmonella* se puede propagar dentro de lotes de aves desde diferentes formas directas como alimentos contaminados, especialmente los que tienen proteína animal; vectores biológicos como ratones, moscas y otros insectos; aves silvestres y personas. La transmisión vertical a la progenie se relaciona con la contaminación de la cascara de los huevos. La transmisión horizontal se asocia al contacto directo entre aves, la ingestión de heces contaminadas o cama, agua contaminada, personal o equipamiento con pésimo manejo sanitario afirma (SAG. 2016)

c) Medidas sanitarias

Según (SAG. 2016) El control consiste desde estrategias para evitar futuras enfermedades que incluyen desde la compra de aves de reposición, desde reproductoras libres, alimento chequeado con medidas de mitigación de riesgo, bioseguridad efectiva, manejo de la microbiota y la vacunación con cepas vivas (SE) y muertas (SE y ST). Estas bacterias son sensibles al calor. La cocción destruye la *Salmonella* en la carne de ave y huevos (57°C por 70 minutos). La pasteurización destruye las bacterias. SE sobrevive en la cama y alimento más de dos años, aunque en el caso de la cama depende del pH y la actividad de agua. En el caso de ST se ha demostrado que puede persistir 16 meses en alimento y 18 meses en la cama a 25°C.

6.4.2 *Escherichia. coli*

La *Escherichia coli* es el nombre en honor al científico alemán Theodore von Escherich que la describe en 1885. Crece rápidamente en medios de cultivos simples. La *E. coli* es una bacteria Gram negativa, También puede vivir en condiciones de ambiente con pobre presencia de oxígeno como es el intestino; y se puede aislar en este último hasta 10^7 hasta 10^9 organismos por gramo de heces. (Vásquez, 2011)

Las infecciones por *Escherichia coli* se dan en pollos de todas las edades y categorías. Estas están relacionadas principalmente con pobres o pésimas condiciones higiénicas, procedimientos tecnológicos mal realizados, o enfermedades respiratorias. (Dinev. 2014)

La *Escherichia coli* en las primeras 48 horas de vida puede colonizar el intestino de los animales, y aunque solo una pequeña cantidad de cepas son clasificadas como patógenas esta se instala como flora normal no siendo peligro de enfermedad. (Vásquez, 2011)

Escherichia coli causa infecciones como la colibacilosis aviar esta causa elevados niveles de mortalidad y morbilidad en la industria avícola. (Carranza et al 2012).

(Barnes et al 2008) menciona que la Colibacilosis es un síndrome complejo que se caracteriza por lesiones multiorgánicas, tales como Aerosaculitis asociada a pericarditis, perihepatitis y peritonitis, que resulta en alta morbilidad y mortalidad (Jansen et al 2003). Este síndrome, causado por cepas patógenas de *E. coli*, puede presentarse tanto de forma local como sistémica.

a) Características antigénicas

El tamaño de la *Escherichia coli*, es entre 1 hasta 3 μ con capacidad móvil a través de flagelos (**antígeno H**) que son órganos filiformes que pueden medir varias micras, también tiene fimbrias (**Antígeno F**) que son órganos más pequeños, que no poseen movilidad; pero por ser de naturaleza proteica (pilina), poseen propiedades antigénicas y hemoaglutinantes; En tanto que pili que son los pelos ligeramente más largos que se utilizan en la conjugación bacteriana para intercambiar material genético desde la célula donadora hasta la receptora y a veces en el desplazamiento según (Vásquez, 2011)

6.4.3 Parásitos Gastrointestinales.

a) **Áscaris**. Uno de los parásitos intestinales más comunes de la avicultura tanto en pollos como pavos, *Ascaridia galli*. Las formas adultas miden entre

4 a 7,5 centímetros de largo y tienen el grosor de un lápiz, así que se pueden ver fácilmente a simple vista.

Las aves muy infectadas pueden mostrar decaimiento y diarrea. El daño principal está en la reducción de la eficiencia alimenticia, pero también se han observado muertes en casos más severos.

Los pollos de 3 a 4 meses de edad muestran resistencia a la infección.

Ocasionalmente, se han encontrado especímenes del parásito en los huevos de las aves. La lombriz, aparentemente, se desplaza del intestino al oviducto y, de esta manera, queda incluida en el contenido del huevo cuando éste se forma.

b) *Capillaria*. Existen varias especies de *Capillaria* que viven en las aves. La *Capillaria annulata* y la *Capillaria contorta* que aparecen en el buche y en el esófago. Allí pueden producir el engrosamiento e inflamación de las mucosas

En gran cantidad es fácil encontrar los parásitos en la necropsia. No es fácil observar los huevos en los excrementos, debido a su muy pequeño tamaño.

Como muchas veces no hay tratamiento contra *capillaria*, el mejor control se logra por medio de prevención. Algunas drogas, administradas en bajas dosis pueden servir para disminuir altos niveles de infección en granjas donde existan estos problemas.

c) *Coccidios*. Se conocen nueve especies diferentes de coccidios, pero son cinco las que causan las mayores pérdidas en la avicultura mundial. Cada una de las especies afecta una porción diferente del tracto:

Eimeria acervulina (mitad superior del intestino delgado),
E. tenella (ciegos),
E. necatrix (mitad media del intestino delgado),
E. maxima (mitad inferior del intestino delgado) y
E. brunetti (mitad inferior del intestino delgado, recto y cloaca).

Estos organismos destruyen principalmente las células del tracto digestivo que normalmente son las que absorben los alimentos. Las formas agudas de la coccidiosis producen serios daños en los tejidos, causando hemorragias y al final hasta la muerte.

Los coccidios una vez dentro de la pared intestinal interna, se dividen repetidamente mediante un proceso de reproducción asexual, produciendo grandes cantidades de cuerpos llamados merozoitos, los cuales son los que causan mayor daño en las paredes internas del intestino y ciegos.

Al salir los merozoitos de las células del epitelio, rompen la pared celular, lo cual produce una hemorragia. Esta hemorragia es uno de los síntomas característicos de la coccidiosis, pues la sangre se puede observar a simple vista en las excretas.

- d) **Cecales:** La lombriz cecal, *Heterakis gallinae*, es idéntica al ascaris, en su presentación y su ciclo de vida; excepto por su tamaño, la cual puede medir unos 12 mm. Las lombrices adultas pueden observarse con facilidad en los ciegos de las aves infectadas.

6.4.4 Infecciones respiratorias

Las enfermedades respiratorias de los pollos no son causadas normalmente por un solo agente, sino que son de origen multifactorial y su expresión es el resultado de diferentes interacciones entre condiciones medioambientales, los mecanismos de defensa del propio animal y los agentes infecciosos en la granja.

Son así muy importantes:

- Calidad del pollito para buenas condiciones de la respuesta.
- Buen manejo para evitar polvo, gases, stress.
- Bioseguridad para disminuir presión infecciosa de desafíos.
- Vacunaciones con productos y programas adecuados.
(Torrubia, 2015)

a) **Agentes infecciosos responsables de procesos respiratorios en las aves:**

Virus; *Paramixovirus*, *Orthomixovirus*, *P. neumovirus*, *Coronavirus*, *Herpesvirus*, virus de la viruela aviar.

Microplasmas: *Gallisepticum*, *Sinoviae*, *Iowa*, *Meleagridis*

Bacterias: *E. coli*, *Pasteurellas*, *Ornithobacterium*, *Gallibacterium anatis*, *Avibacterium Paragallinarum*, *Bordetellas*, *Haemophilus*, *Estafilococcus*, *Streptococos*.

Hongos: *Aspergillus*

Herramientas para evitar la patología respiratoria

1.- Manejo

- Ubicación
- Aislamiento
- Construcción
- Ventilación mínima requerida.
- Calidad del aire

2.- bioseguridad

- Aislamiento
- Barreras físicas
- Higiene

(Martínez, Sanz. 2016)

6.4.5 Cultivo y antibiograma

a) Cultivo. Este es un método para la multiplicación de microorganismos en la microbiología, así como bacterias, donde se prepara un medio óptimo para obtener el resultado esperado.

Un cultivo nos sirve como un método esencial para estudiar bacterias y otros microorganismos que causan enfermedades en la veterinaria y la medicina.

Un microorganismo se puede sembrar en dos medios, medio líquido o en la superficie de un medio sólido de agar.

Los medios de cultivo contienen distintos nutrientes esenciales que van, desde azúcares simples hasta sustancias complejas como la sangre o el extracto de caldo de carne. Para aislar o purificar una especie bacteriana a partir de una muestra formada por muchos tipos de bacterias, se siembra en un medio de cultivo sólido donde las células que se multiplican no cambian de localización; tras muchos ciclos reproductivos, cada bacteria individual genera por escisión binaria una colonia macroscópica, compuesta por decenas de millones de células similares a la original. Si esta colonia individual se siembra a su vez en un nuevo medio crecerá como cultivo puro de un solo tipo de bacteria. (Wikipedia. 2019)

La principal diferencia entre un medio de cultivo sólido y uno líquido es que el medio de cultivo sólido contiene un 1,5–2% de agar-agar, mientras que el medio líquido no contiene agar-agar. (Wikipedia. 2019)

b) Antibiograma. También conocido como. Pruebas de sensibilidad, Pruebas de resistencia microbiana a fármacos, Pruebas de susceptibilidad microbiana, Cultivo y sensibilidad.

¿Por qué hacer el análisis?

Para determinar la probabilidad de que un agente antimicrobiano o anti fúngico determinado sea capaz de contrarrestar el crecimiento bacteriano o fúngico que ocasiona la infección.

¿Qué es lo que se analiza?

Se emplea el término sensibilidad microbiana (antibiograma) para describir aquella situación en la que los microorganismos como bacterias u hongos no son capaces de crecer en presencia de uno o varios fármacos antimicrobianos. El antibiograma se realiza principalmente en el caso de las bacterias y hongos, una vez se sabe que estos microorganismos son los responsables de una infección. La prueba determina la eficacia de un agente.

¿Cuándo se solicita?

Suele solicitarse al mismo tiempo que el cultivo, ya sea de sangre, orina, líquido biológico o de una herida. Sin embargo, el antibiograma se realiza normalmente cuando los resultados del cultivo son positivos para uno o varios microorganismos. También puede solicitarse un antibiograma si la infección no responde al tratamiento, para averiguar si el patógeno ha desarrollado resistencias y para conocer qué agente antimicrobiano resultará más eficaz para combatir la infección.

¿Qué significa el resultado?

Los resultados de esta prueba suelen informarse como:

- Sensible - puede ser una elección apropiada para el tratamiento
- Intermedio - el fármaco puede ser efectivo a elevadas dosis o con dosificaciones más frecuentes o efectivo sólo en algunas zonas del organismo en las que el antibiótico penetra fácilmente alcanzando concentraciones adecuadas.
- Resistente - el fármaco no es efectivo para inhibir el crecimiento del microorganismo.

(SEQC, 2017)

6.5 Hipótesis.

Se identificaron los efectos en los aspectos sanitarios en pollos de engorde con la administración de *Bacillus subtilis* en el agua de bebida.

6.6 Variables.

6.6.1 Independiente.

Dosis del probióticos en el agua de bebida

6.6.2 Dependientes.

- Muestra de ciego para *E. coli*
- Muestra de ciego para *Salmonella*

- Muestra de ciego para parásitos gastrointestinales
- Hisopado de mucosa nasal para infecciones respiratorias
- Cultivo y Antibiograma

7. Metodología

7.1 Ubicación del estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de análisis, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, (ULEAM) Ubicada en la ciudad de Manta, Av. Circunvalación – Vía San Mateo (Latitud 0°57' S y de longitud, 80°42' W y altitud aproximada de 20 msnm en el periodo 2019.

7.2 Tipo de Diseño Experimental

Bloques completamente al azar DCA

7.3 Diseño Experimental

Para el experimento se utilizaron 9 aves, la primera al día 0, cuatro al día 14 y cuatro al día 42 de las 120 que se criaron en Convento. Las cuales llegaron al laboratorio de la ULEAM vivas, donde se procedió a sacrificarse para obtener las muestras de ciego para los análisis de *E. coli*, *Salmonellas* y muestras para parásitos intestinales también se sustrajo muestras por hisopado de la mucosa nasal para detectar bacterias que causen enfermedades respiratorias finalizando con un estudio de cultivo y antibiograma.

En campo las aves se dividieron en cuatro grupos, un grupo control sin tratamiento y tres grupos con la administración de *Bacillus subtilis* como probióticos en el agua de bebida, a las concentraciones de 10^6 – 10^8 – 10^{10} respectivamente. Cada tratamiento tendrá tres repeticiones con diez aves por repetición.

T0= sin tratamiento

T1= 10^6 UFC

T2= 10^8 UFC

T3= 10^{10} UFC





7.4 Cepa de *Bacillus subtilis*

La cepa de *Bacillus subtilis* nativa, fue facilitada por la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, donde fue aislada y caracterizada originalmente, y mantenida en medio de cultivo MRS (Medio líquido Man, Rogosa y Sharpe) (Merck, Darmstadt, Alemania), a -80°C . La cepa de *B. subtilis* será descongelada y se incubará en el medio de cultivo MRS por 24 horas a 37°C , en condiciones microaerofilicas, centrifugándose posteriormente a $5000 \times \text{G}$, por 10 minutos a 4°C . El sobrenadante se descartará y el sedimento se lavará tres veces con agua desionizada, como lo describe Shokryazdan y col. en 2017.

7.5 Medio de cultivo líquido a base de caldo nutritivo.

Se utilizó Agar nutritivo en dosis de 13g / litro. Se necesitó 3 litros de caldo nutritivo por lo que se mezcló 39g/3litros de agua destilada con el agitador magnético, se homogenizó la mezcla por un par de minutos, posteriormente se autoclavó a temperatura 121°C por 30 minutos se dejó enfriar en la cámara de flujo laminar para evitar contaminación de otros organismos.

7.6 Manejo del experimento

- a) Se sacrificó nueve pollos en total, uno el día 0, cuatro el día 14 y cuatro el día 42 mediante dislocación occipital para la toma de muestras de **ciego** etapa 1,2 y 3, **coprológica** etapa 1 y 3 y **tracto respiratorio** etapa 3.
- b) Mediante un hisopado se colocó las muestras en tubos de ensayo rotulados T0, T1, T2 y T3 en todas sus etapas en 10ml de agua destilada para *E. coli* y en 10ml de agua destilada con Tetrionato pre enriquecida con Iodo y Ioduro de potasio para *Salmonella* incubando por 24 horas.
- c) **Diluciones, preparación de medio y siembra.**
- 1.- Se Realizó diluciones desde la muestra madre hasta la -15 para obtener menos carga bacteriana de cada tratamiento.
 - 2.- Se preparó el medio de cultivo con Agar MacConkey para siembra de 12 cajas Petri para *Salmonella* y 12 cajas para *E. coli* en cada etapa. Mediante agua destilada 300 ml y 15.46g de Agar MacConkey siguiendo las recomendaciones del fabricante. De la siguiente manera con una regla de tres:
$$51.55 \times 300 / 1000 = 15.46g$$
 - 3.- Se vertió 10ml de agar en cada caja Petri esperando a que gelatinice, mediante las diluciones hechas se sembró mediante la técnica de aza en la etapa 2 y mediante micro pipeta, puntas amarillas 100 μ para la etapa 1 y 3 para reducir la carga bacteriana. Dejándolas por 24 horas en incubación para recurrir al conteo de colonias.
- d) **Cortes Histológicos.** Se realizó necropsia de dos porciones del yeyuno, duodeno e íleon de cada tratamiento T0, T1, T2 y T3 en todas sus etapas; una porción abierta y la otra redonda colocados en cuadritos de hoja de corcho con respectivos alfileres, puestos en envases con formol para realizar cortes histológicos.
- e) Mediante el programa Photoshop con la herramienta regla se procedió a medir las microvellosidades tal como duodeno, yeyuno e íleon de todos

los tratamientos y unas cuantas imágenes de grietas, tomando como referencia de medida 1 micra del tejido. Las imágenes fueron tomadas del microscopio con el objetivo x40.

7.7 Materiales en laboratorio.

Cajas Petri	Matraces	Puntas celestes	Espátula
Pipetas	Tijeras y pinzas	Envases muestra	de Platos de pesaje de aluminio
Micro pipetas	Papel corcho	Vasos precipitación	de Guantes
Tubos de ensayo	Aluminio	Hisopos	Bala magnética
Gradillas	Alfileres	Marcador	mascarilla

Reactivos:

Alcohol	Agar Nutritivo	Iodo de Potasio	Suero fisiológico
Agar MacConkey	Tetracionato	Iodo	Formol
Agua destilada			

Equipos:

Autoclave	Cámara de flujo laminar	Agitador magnético
Incubadora	Balanza analítica	Microscopio

7.8 Análisis de Resultados

Los datos serán registrados en planillas diseñadas para tal fin, utilizando estadísticos simples y análisis de varianza a través de un modelo aditivo lineal de la siguiente manera;

Variables dependientes = $\mu + T_i + P_j + \epsilon$

Dónde:

μ : Constante

T_i : iésimo tratamiento

Pj: jotaésimo periodo

ε: Error experimental

Para determinar el efecto de las variables independientes sobre las dependientes, será cuando el valor de $P \leq 0,05$.

8. Resultados.

8.1 Conteo de Colonias

Salmonella y *E. coli* . -

Aves día 0.

No hubo UFC

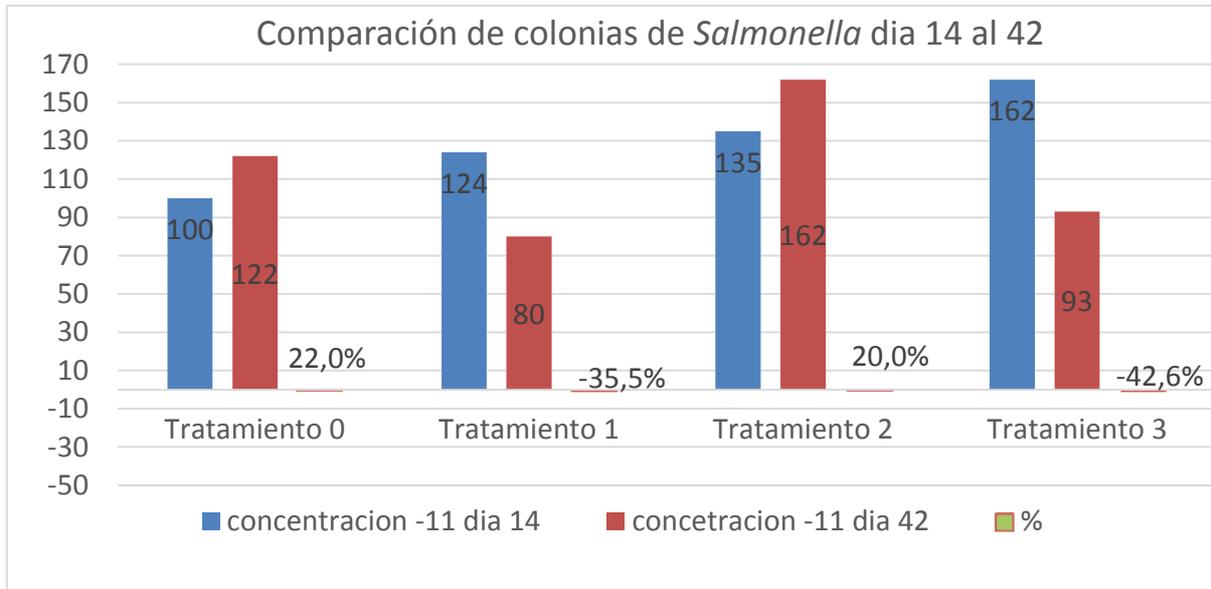
Tabla 1. Conteo de colonias para *Salmonella* y *E. coli* día 14.

<i>Salmonella</i>			<i>Escherichia coli</i>		
Tratamiento	Concentración	UFC	Tratamiento	Concentración	UFC
T0	-11	100	T0	-9	97
T1	-11	124	T1	-9	83
T2	-11	135	T2	-7	84
T3	-11	162	T3	-5	98

Tabla 2. Conteo de colonias para *Salmonella* y *E. coli* día 42.

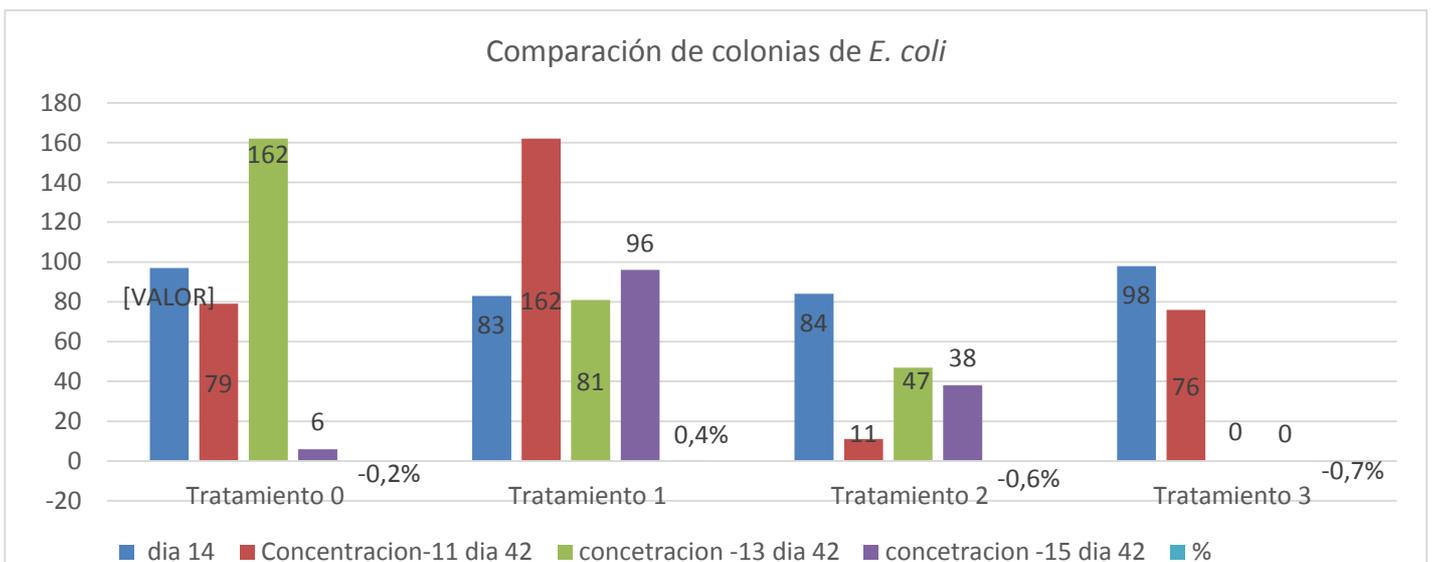
<i>Salmonella</i>			<i>Escherichia coli</i>		
Tratamiento	Concentración	UFC	Tratamiento	Concentración	UFC
T0	-11	122	T0	-11	79
T0	-13	54	T0	-13	162
T0	-15	133	T0	-15	6
T1	-11	80	T1	-11	-
T1	-13	Incontables	T1	-13	81
T1	-15	Incontables	T1	-15	96
T2	-11	Incontables	T2	-11	11
T2	-13	129	T2	-13	47
T2	-15	28	T2	-15	38
T3	-11	93	T3	-11	76
T3	-13	70	T3	-13	0
T3	-15	Incontables	T3	-15	0

Grafico 1. Conteo de colonias de *Salmonella* desde el día 14 al 42.



T0= sin probiótico del día 14 al 42 aumento el 22% de colonias.
 T1= con probiótico del día 14 al 42 disminuyó el 35,5% de colonias
 T2= con probiótico del día 14 al 42 aumento el 20% de colonias.
 T3= con probiótico del día 14 al 42 disminuyó el 42,6% de colonias.

Grafico 2. Conteo de colonias de *E. coli* desde el día 14 al 42.



Ejemplo de formula aplicada.

$$=(((79+162+6)/3)-97)/97*0,01$$

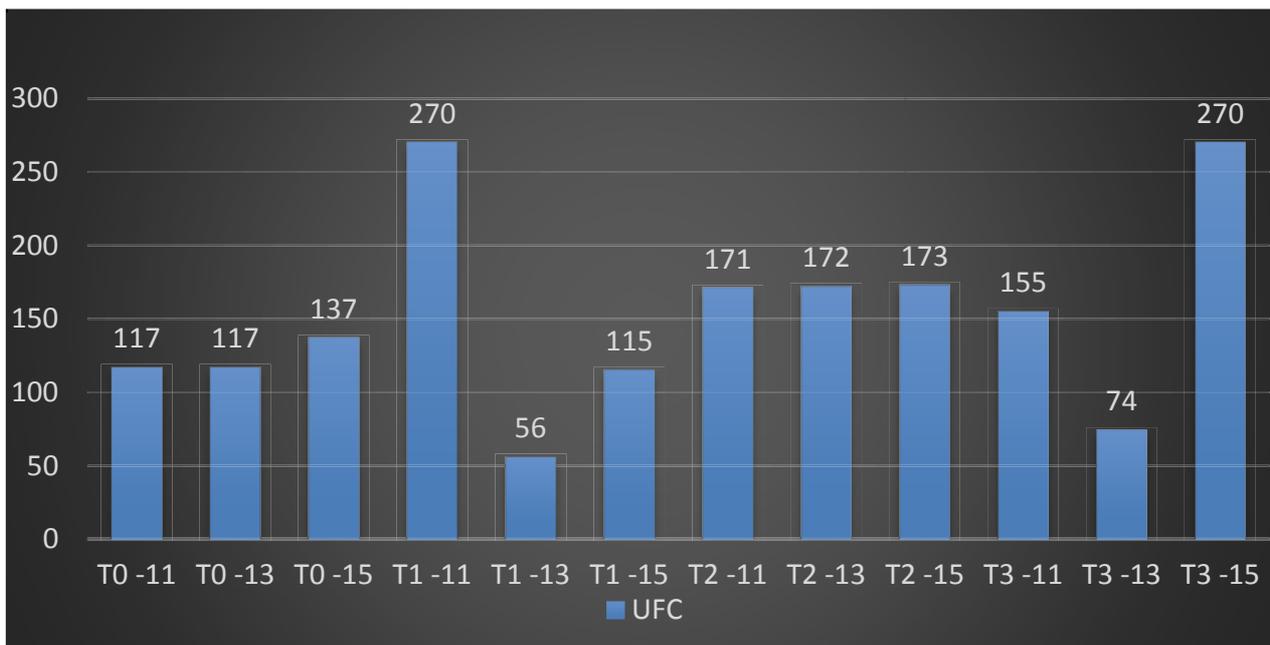
El Tratamiento 3 muestra el mayor porcentaje de disminución de población bacteriana de *E. coli* del día 14 al día 42 con un -7%.

Tabla 3. Conteo e identificación de bacterias en el tracto respiratorio. etapa 3

Tratamiento	Concentración	UFC
T0	-11	117
T0	-13	117
T0	-15	137
T1	-11	-
T1	-13	56
T1	-15	115
T2	-11	171
T2	-13	172
T2	-15	173
T3	-11	155
T3	-13	74
T3	-15	270

Se detectó presencia de *Staphylococcus* en los tratamientos. Comprende microorganismos que están presentes en la mucosa y en la piel de los humanos y de otros mamíferos y aves.

Gráfico 3. Conteo de colonias bacterianas en el tracto respiratorio



Si hiciera una media quedaría así:

T0 =124
T1 =147
T2 =172
T3 =166

Tabla 4. Resultados Coproparasitarios etapa 1.

Etapa 1

Color	Amarilla
Consistencia	Blanda
Parasitológico	No se observan parásitos

Tabla 5. Resultados Coproparasitarios etapa 3.

Etapa 3

Muestra	T0	T1	T2	T3
Color	Verdosa	Amarilla	Amarilla	Amarilla
Consistencia	Blanda	Blanda	Líquida mucoide	Blanda mucoide
Parasito	No hay	No hay	No hay	No hay
Leucocitos	-	3-4 P.C	-	15-20 P.C
Hematies	3-4 P.C	3-4 P.C	6-7 P.C	4-6 P.C
Picoitos	-	-	-	4-5P.C

8.2 Fórmulas

Salmonella (tabla 1)

$$\frac{UFC}{Ml\ o\ g} = \frac{162 \cdot 10^{11}}{1ml} = 1.62 \cdot 10^{12}$$

$$\frac{UFC}{Ml\ o\ g} = \frac{100 \cdot 10^{11}}{1ml} = 1 \cdot 10^{12}$$

$$\frac{UFC}{Ml\ o\ g} = \frac{124 \cdot 10^{11}}{1ml} = 1.24 \cdot 10^{12}$$

$$\frac{UFC}{Ml\ o\ g} = \frac{135 \cdot 10^{11}}{1ml} = 1.35 \cdot 10^{12}$$

E. coli (tabla 1)

$$\frac{UFC}{Ml\ o\ g} = \frac{98 \cdot 10^5}{1ml} = 9.8 \cdot 10^6$$

$$\frac{UFC}{Ml\ o\ g} = \frac{97 \cdot 10^9}{1ml} = 9.7 \cdot 10^{10}$$

$$\frac{UFC}{Ml\ o\ g} = \frac{83 \cdot 10^9}{1ml} = 8.3 \cdot 10^{10}$$

$$\frac{UFC}{Ml\ o\ g} = \frac{84 \cdot 10^7}{1ml} = 8.4 \cdot 10^8$$

8.3 Resultados de Antibiograma.

Se realizó siembras de *Salmonellas* y *E. coli* colocando discos de diferentes fármacos en las placas, se dejó incubar por 24 horas para proceder a la lectura.

En el ave pequeña se realizó antibiograma para *Salmonella* y *E. coli* y los sensibilizadores no tuvieron efecto. C30; AX25; T30; AM10

Tabla 6. Resultados de antibiograma en aves día 14.

Nombre de Fármacos	Códigos	<i>Salmonella</i> Mm	Zona de diámetro interpretativa	<i>E. coli</i> Mm	Zona de diámetro interpretativa
<i>Trimethoprim/Sulphamethoxazole</i>	SXT 25	31	sensible	No tuvo efecto	-
<i>Amoxilina</i>	AX 25	20	sensible	No tuvo efecto	-
<i>Chloranphenicol</i>	C 30	40	sensible	11	resistente
<i>Oxytetraciclina</i>	T 30	No tuvo efecto	-	No tuvo efecto	-
<i>Ampicilina</i>	AM 10	No tuvo efecto	-	No tuvo efecto	-

Tabla 7. Resultado de antibiograma en aves día 42.

Nombre de Fármacos	Códigos	<i>Salmonella</i>	Zona de diámetro interpretativa	<i>E. coli</i>	Zona de diámetro interpretativa
<i>Trimethoprim/Sulphamethoxazole</i>	SXT 25	-	-	30mm	Resistente
<i>Amoxilina</i>	AX 25	21 mm	Sensible	16mm	Media
<i>Chloranphenicol</i>	C 30	31 mm	Sensible	-	-
<i>Oxytetraciclina</i>	T 30	11mm	Resistente	11mm	Resistente
<i>Ampicilina</i>	AM 10	20mm	Media	16mm	Resistente

8.4 Nomenclatura para leer o comparar las placas o imágenes.

Pueden estar en letra minúsculas como mayúsculas.

T= Tratamiento (t0, t1, t2, t3)

D= Duodeno

Y= Yeyuno

I= Íleon

Medición de microvellosidades en micras

Etiquetas	Día 0 Pollo # 1		Día 14		Día 42	
-	Plano	redondo	Plano	redondo	plano	redondo
T0 duodeno	6.74	6.68	4.17	10.72	3.94	5.63
T0 yeyuno	6.72	3.54	5.63	5.63	4.41	6.71

P#1= pollo numero 1 o día 0

Las placas terminas en (r) significa redondo y las que no tienen r son planas

TABLA. 8. Medición de microvellosidades.

T0 íleon	4.94	5.61	5.23	-	2.23	6.23
T1 duodeno	-	-	4.39	5.41	7.13	6.13
T1 yeyuno	-	-	9.06	9.06	4.20	7.62
T1 íleon	-	-	4.07	4.69	5.89	6.71
T2 duodeno	-	-	6.03	8.71	6.56	8.45
T2 yeyuno	-	-	7.67	7.58	5.70	12.90
T2 íleon	-	-	7.49	8.12	8.07	6.71
T3 duodeno	-	-	7.98	7.54	10.20	9.70
T3 yeyuno	-	-	7.33	7.19	7.18	9.71
T3 íleon	-	-	9.63	6.59	7.63	7.49

Gráfico 4. Crecimiento de microvellosidades T0.

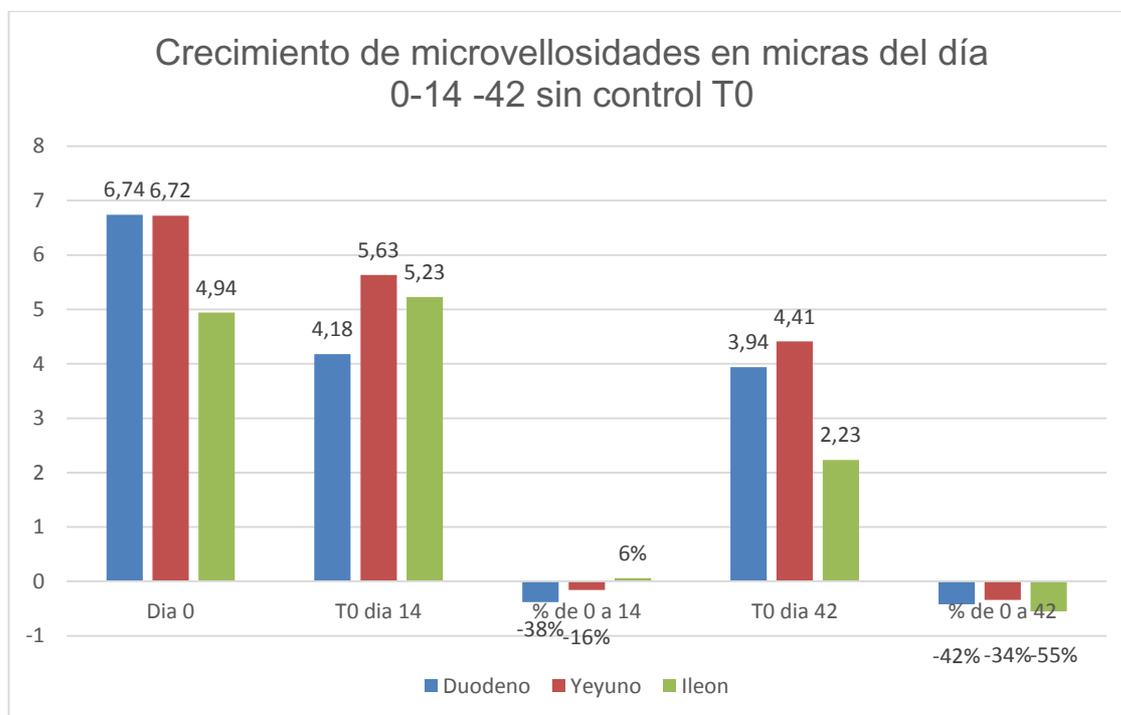


Gráfico 5. Crecimiento de microvellosidades T1.

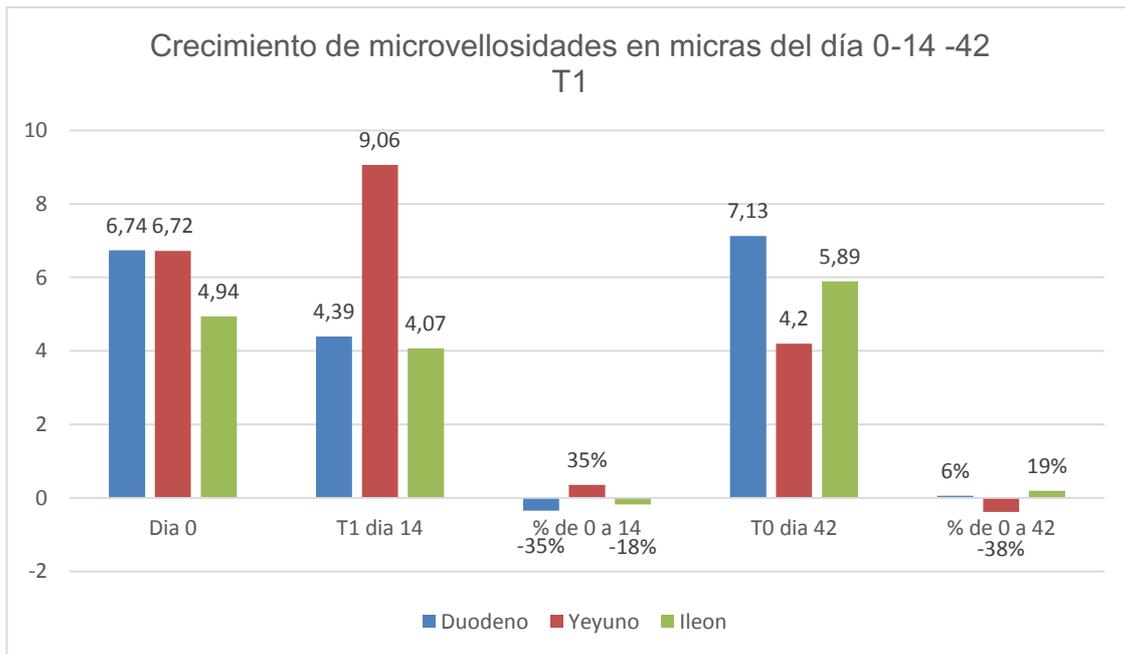


Gráfico 6. Crecimiento de microvellosidades T2.

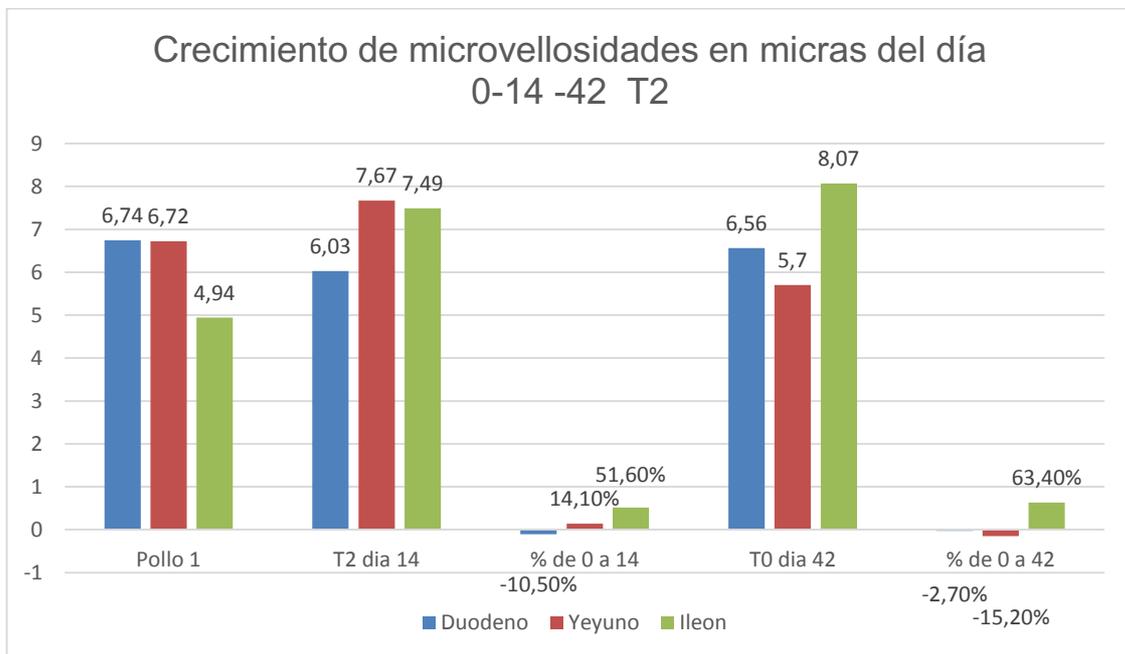
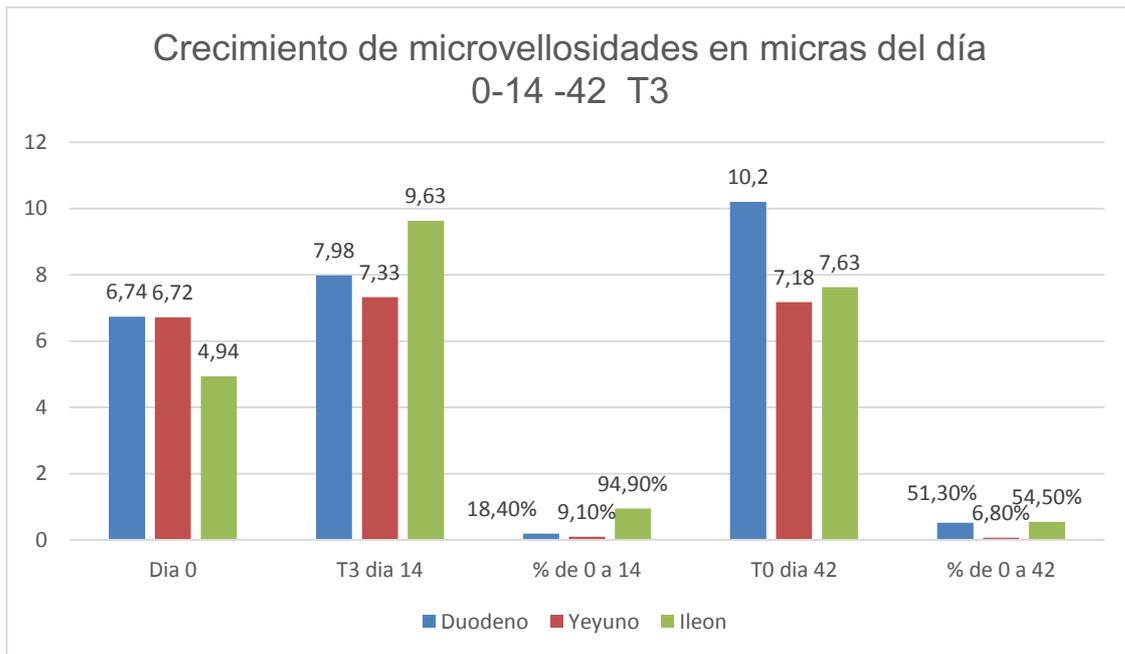


Gráfico 7. Crecimiento de microvellosidades T3.

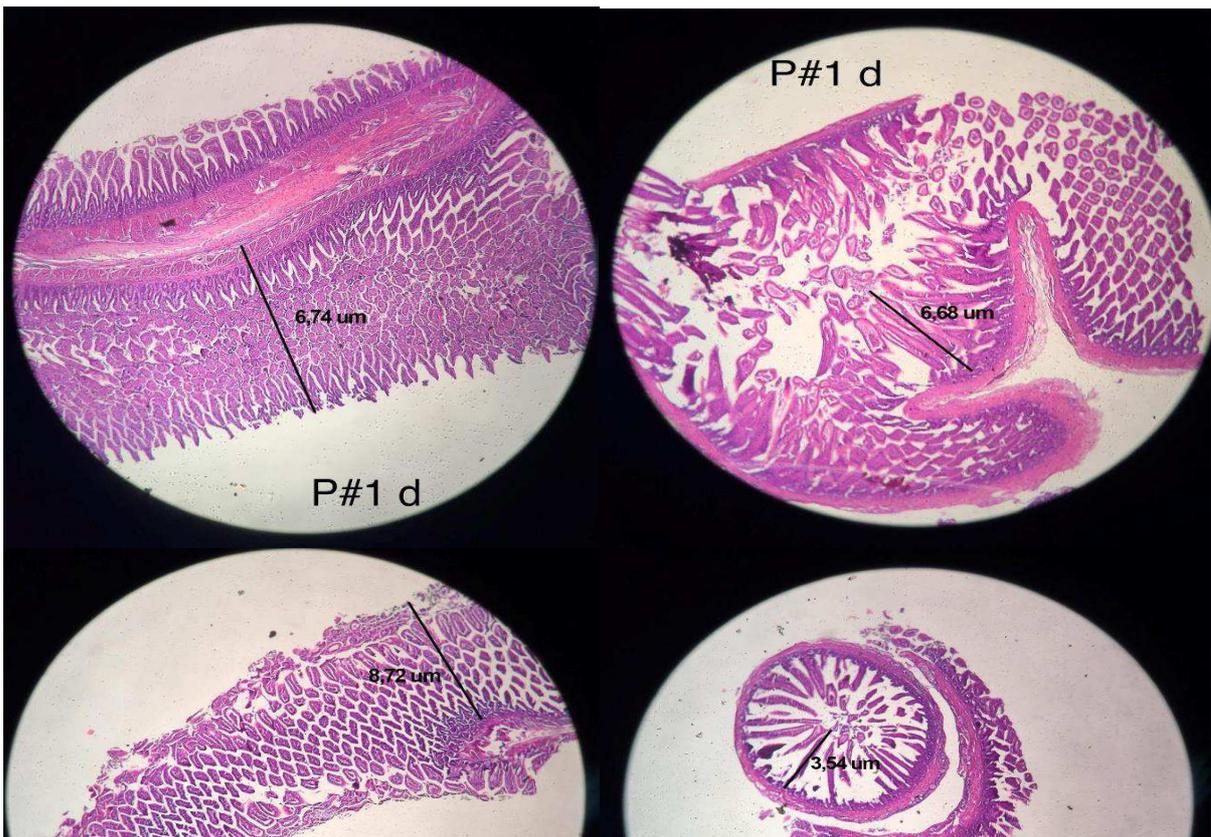


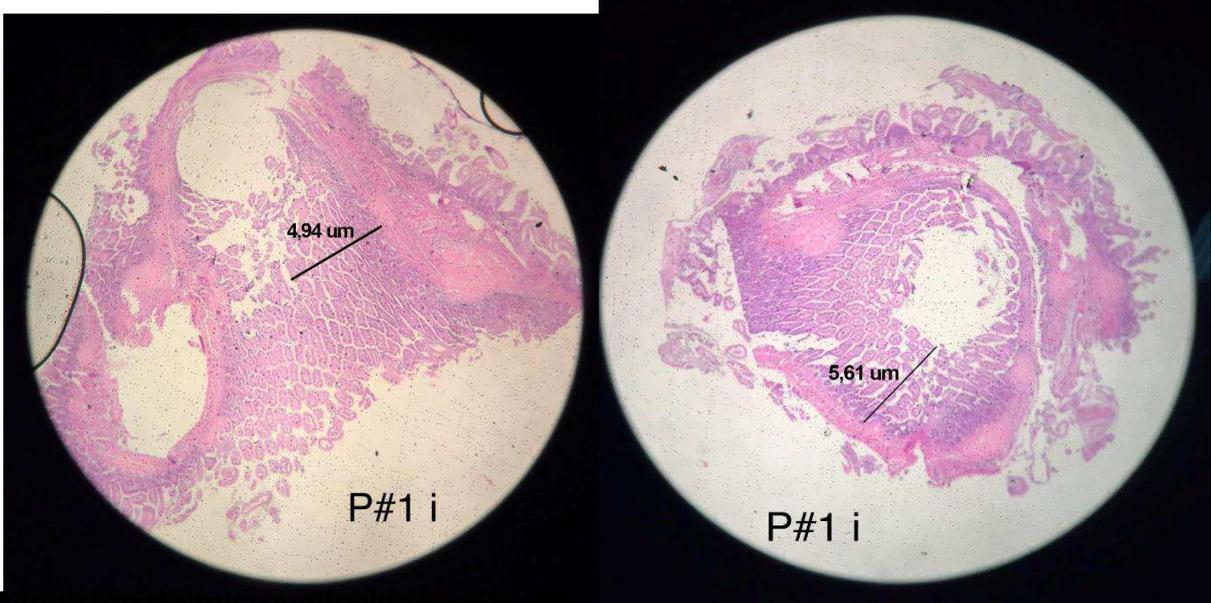
8.5 Imágenes de la medición de microvellosidades.

Medición de microvellosidades Día 0

Planos

Redondos

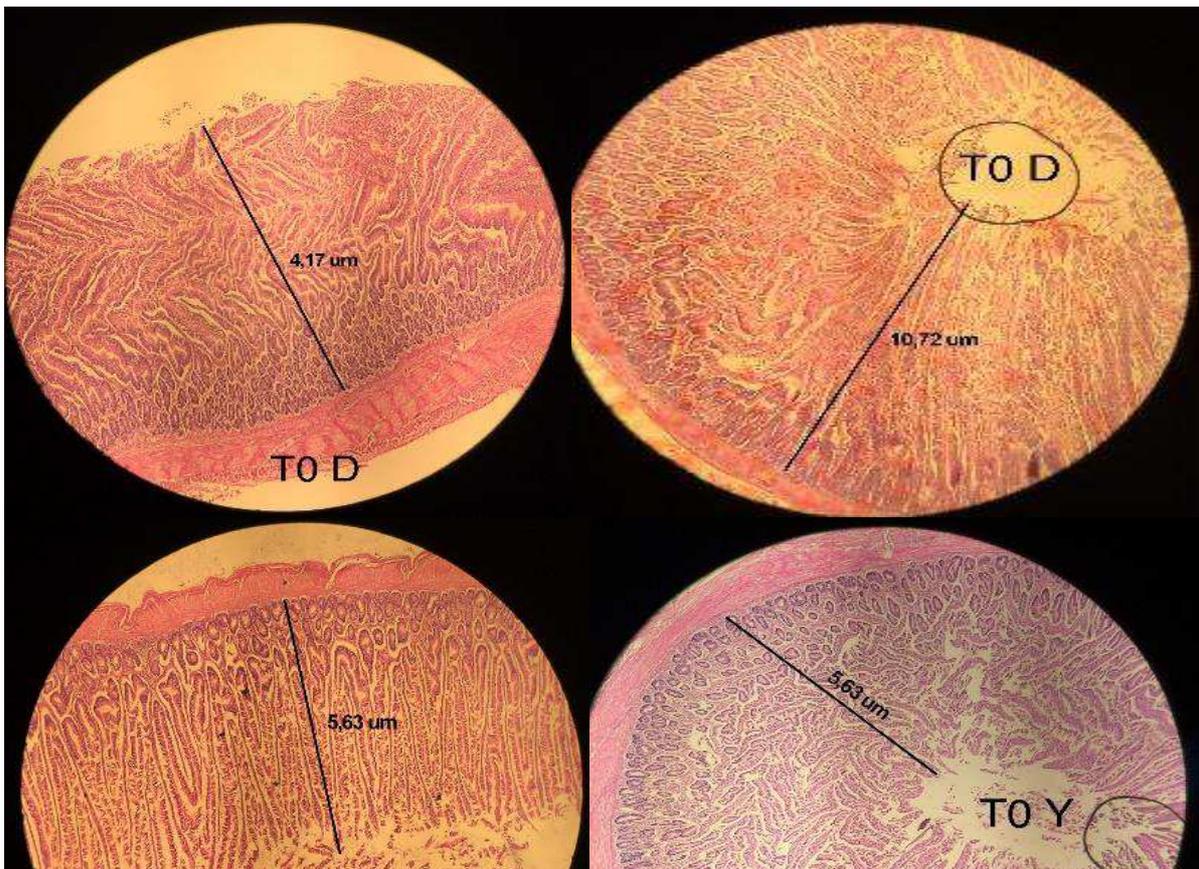


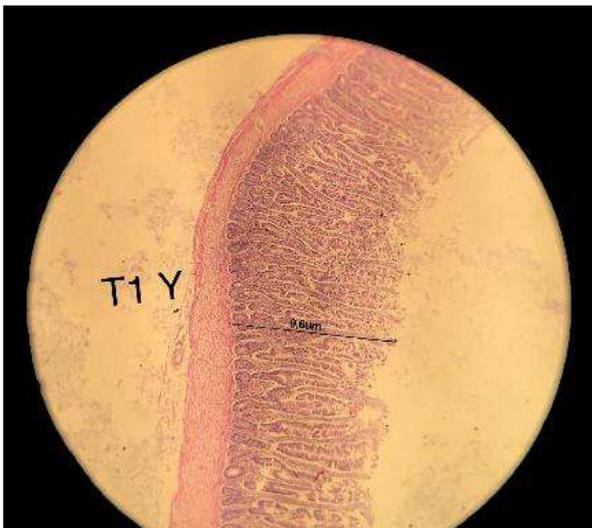
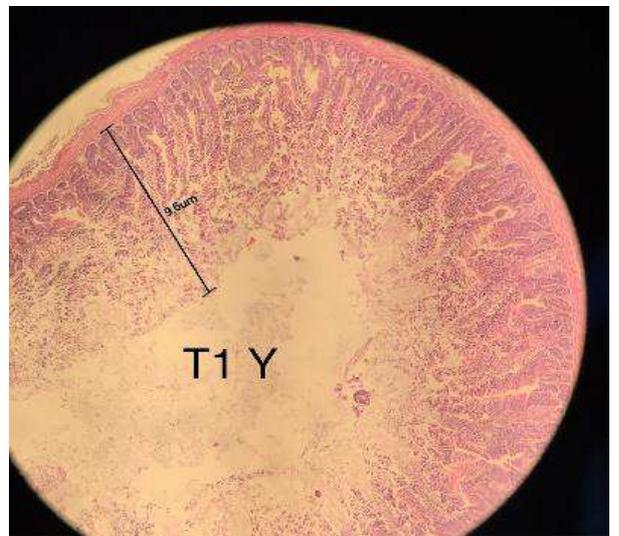
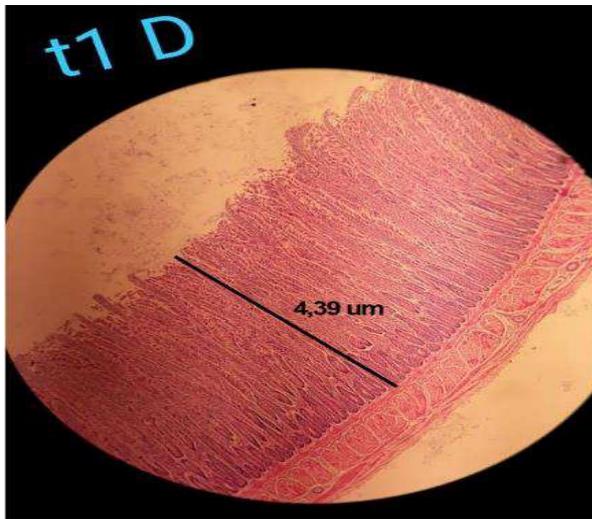
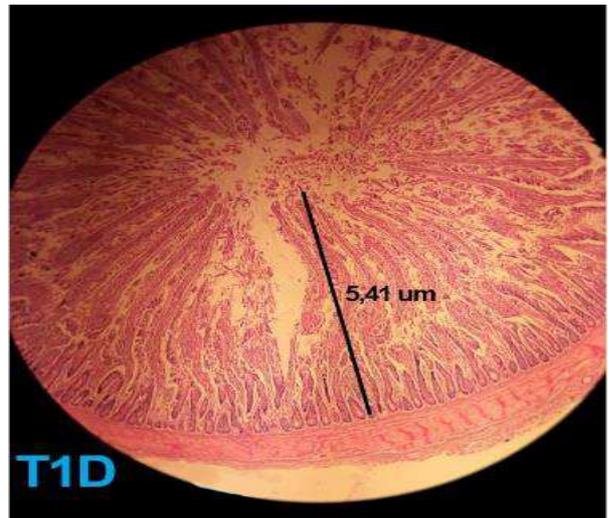
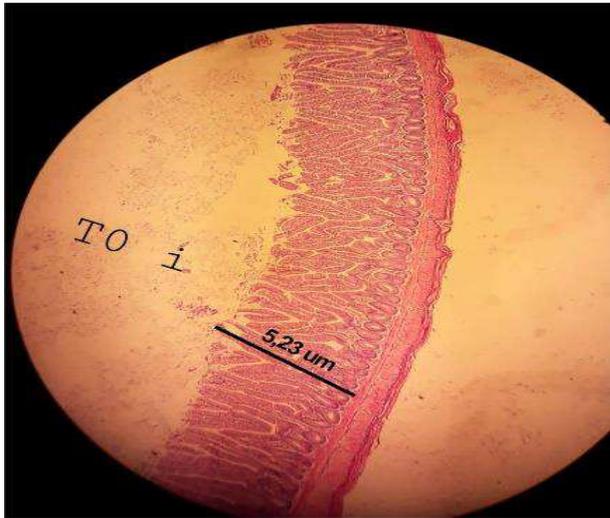


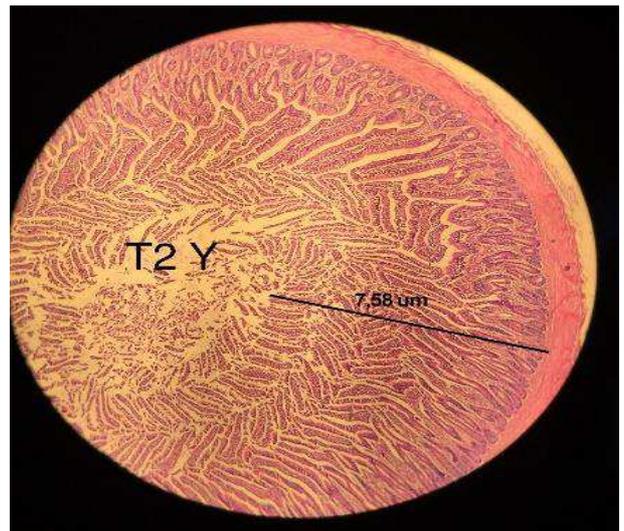
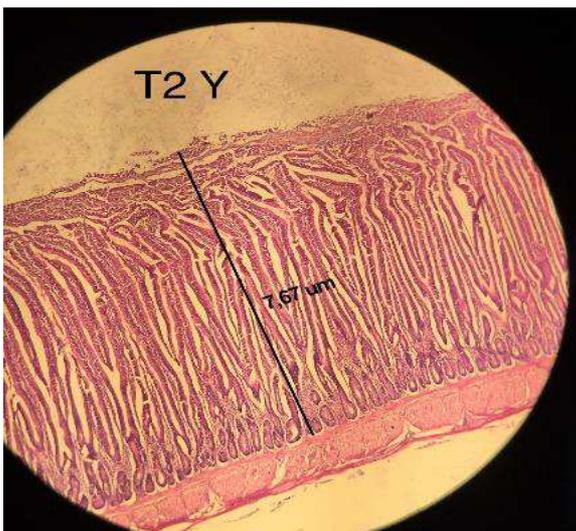
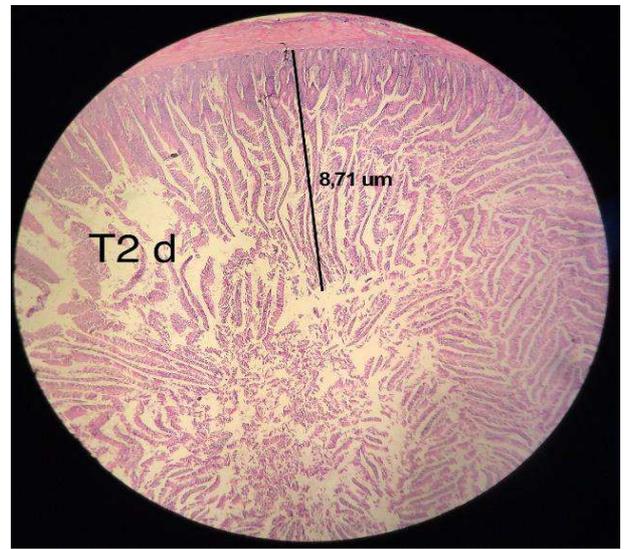
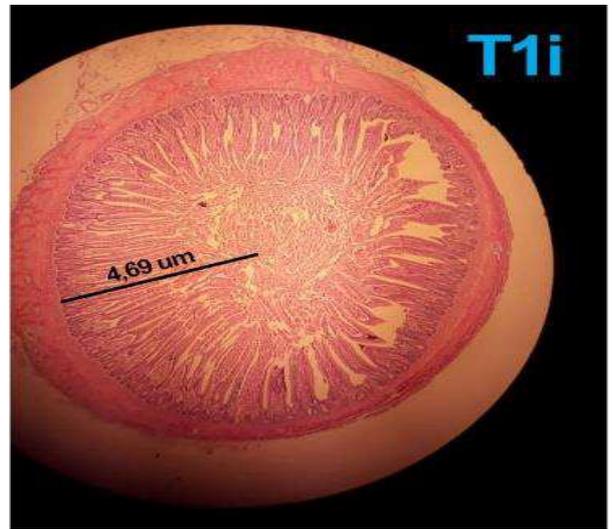
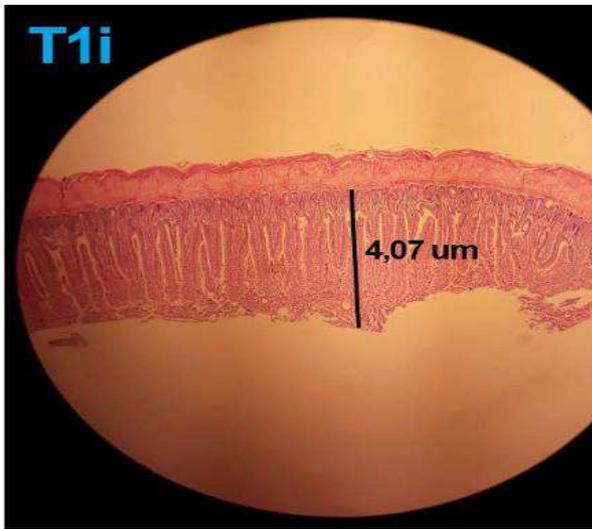
Medición de microvenosidades Día 14

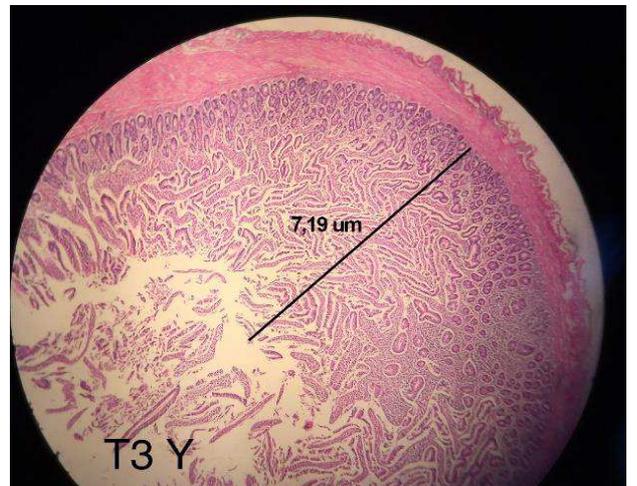
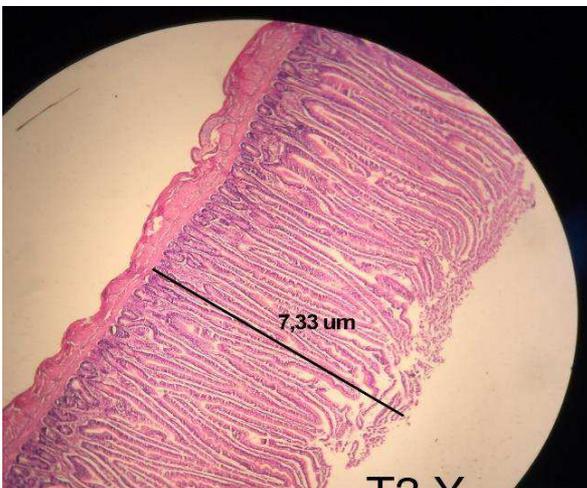
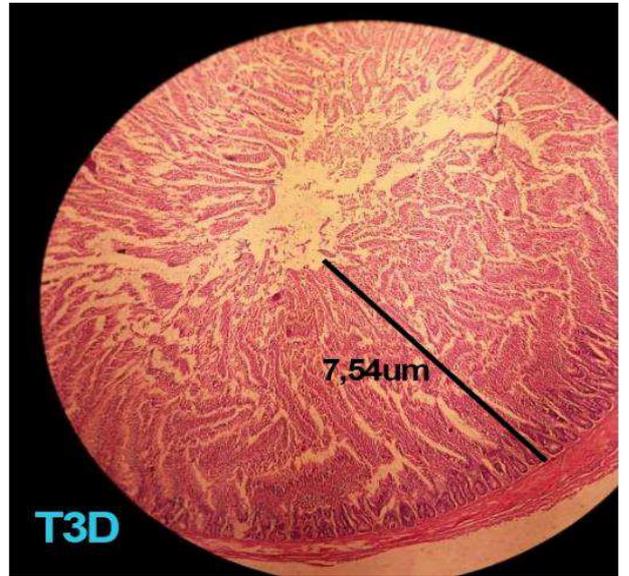
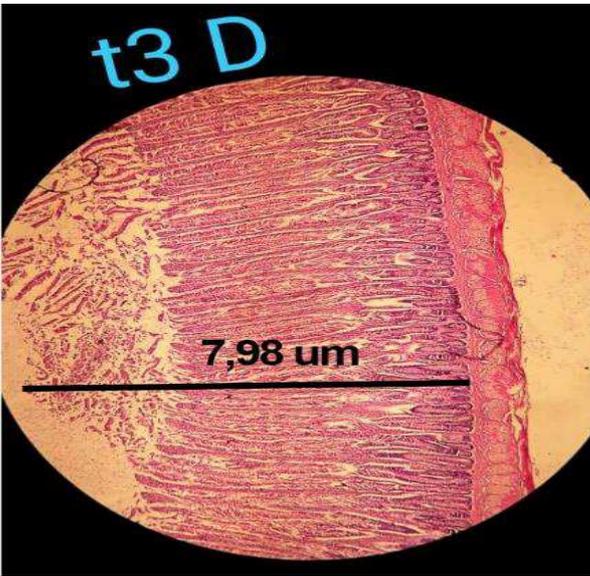
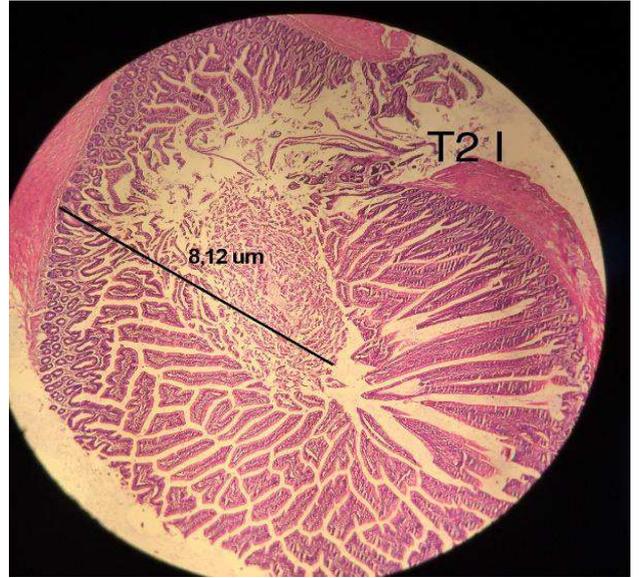
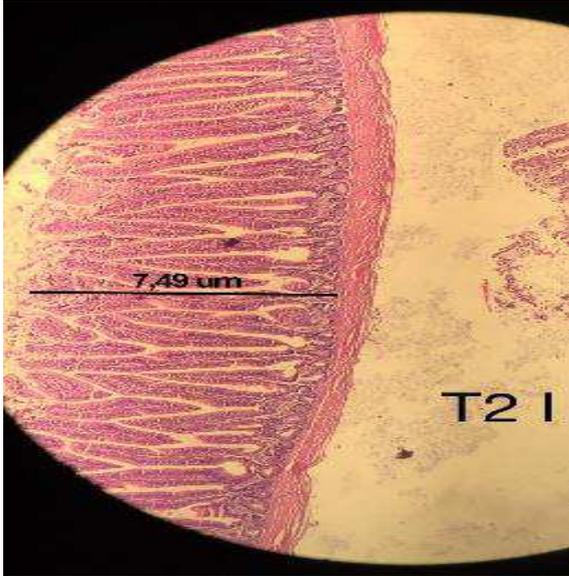
Planos

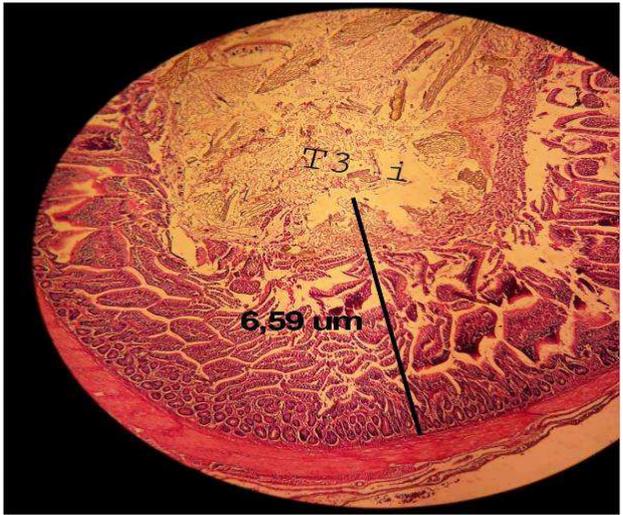
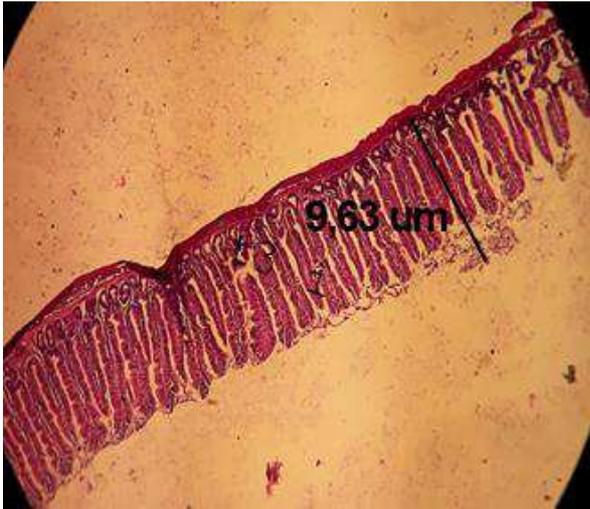
Redondos







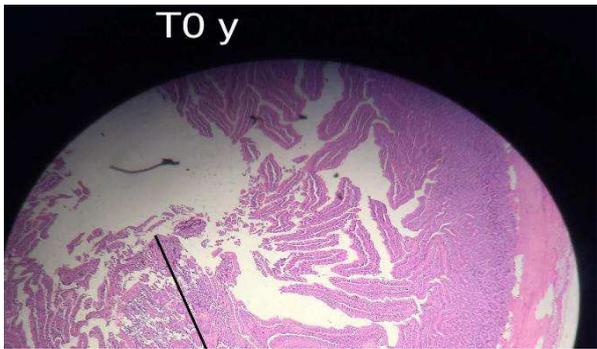
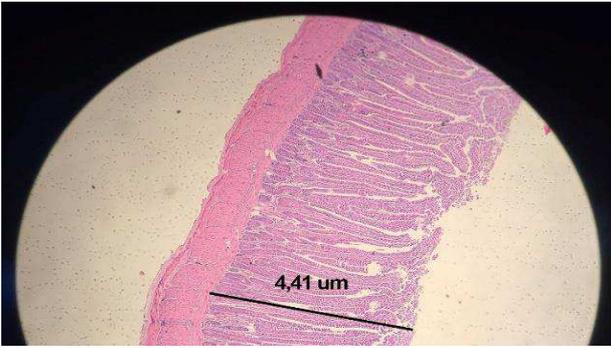
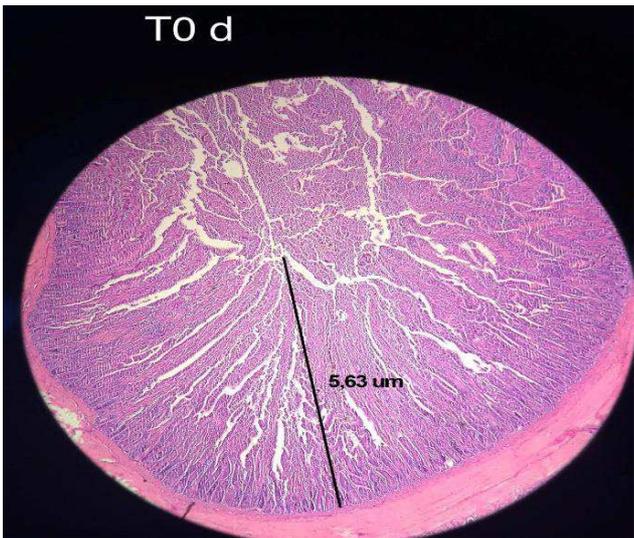
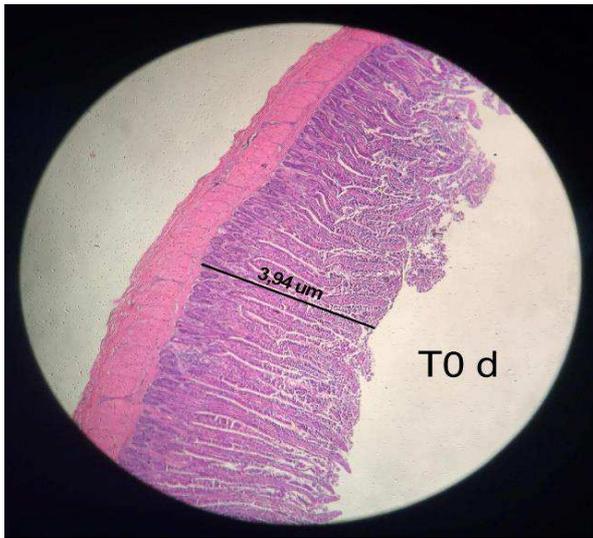


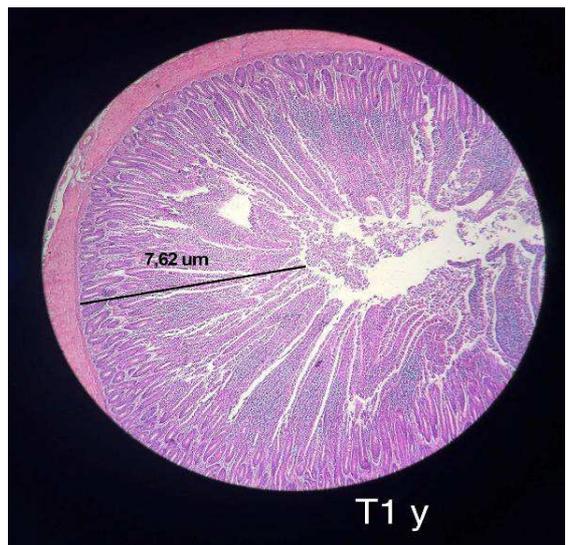
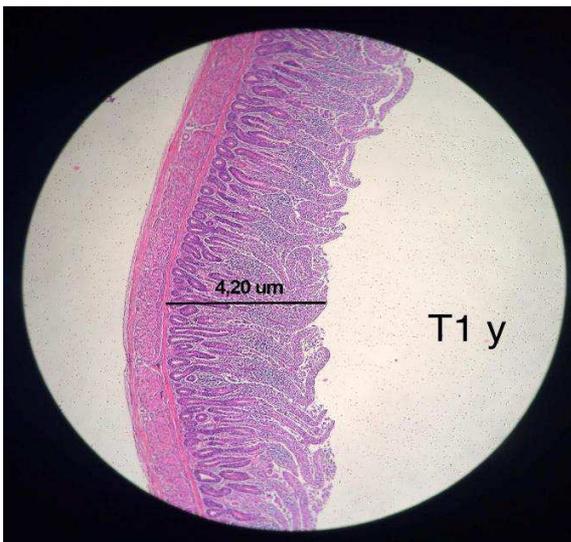
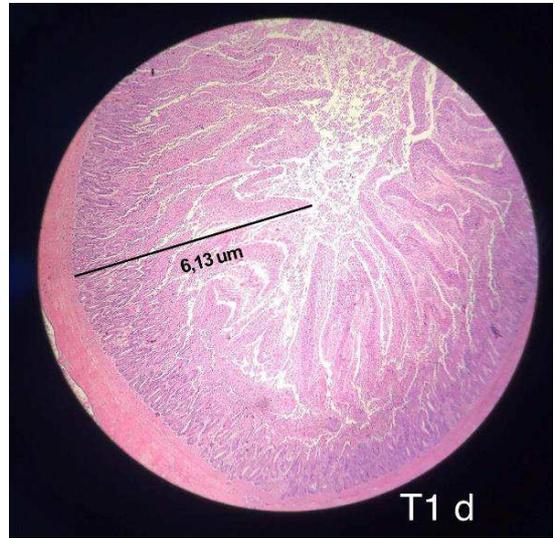
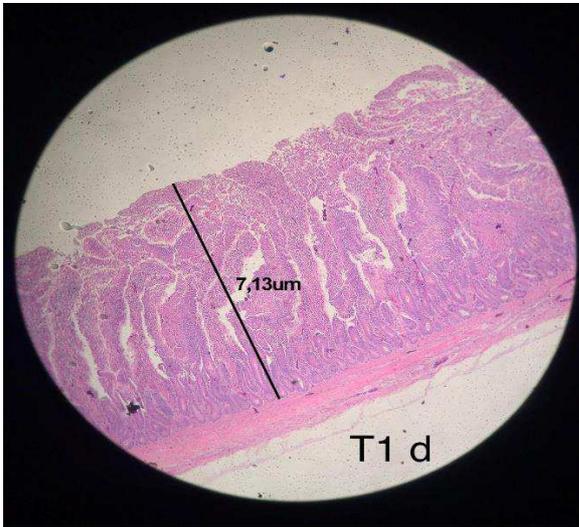
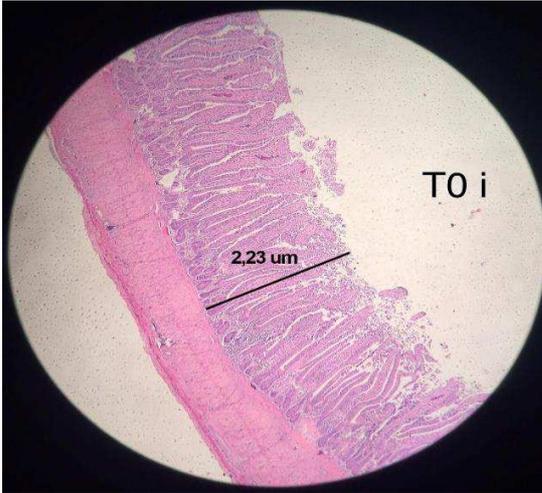


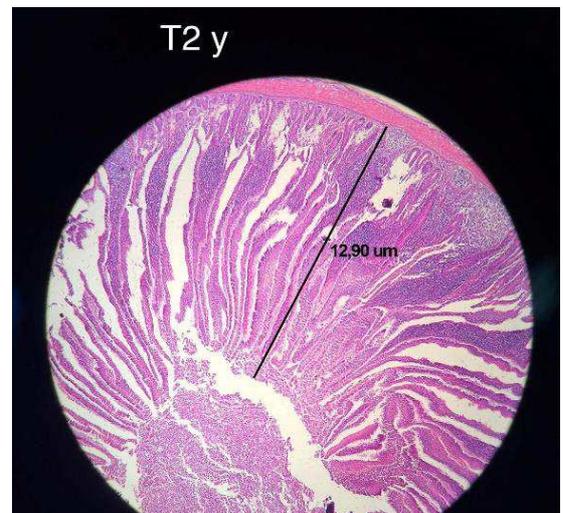
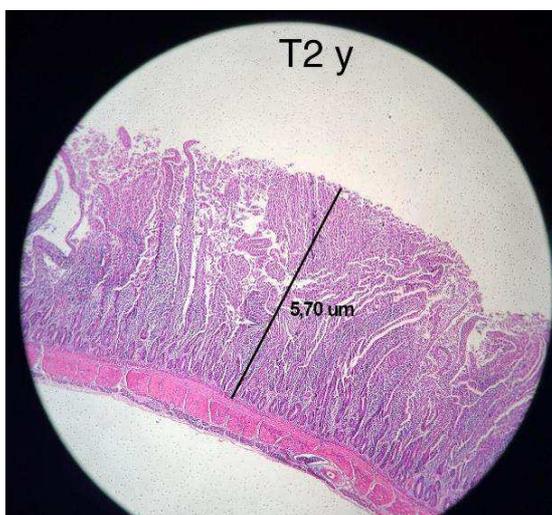
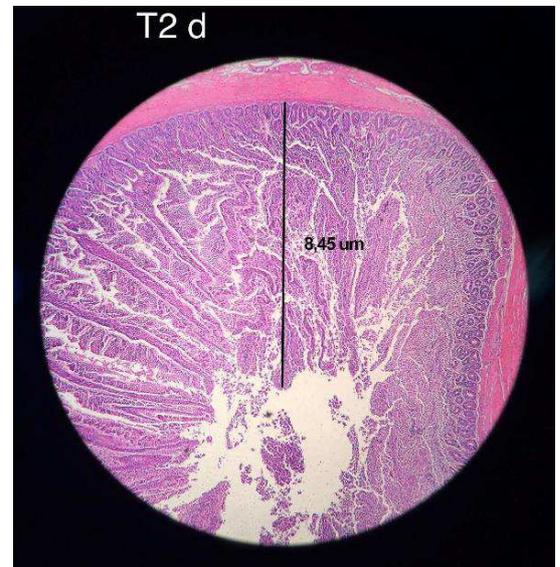
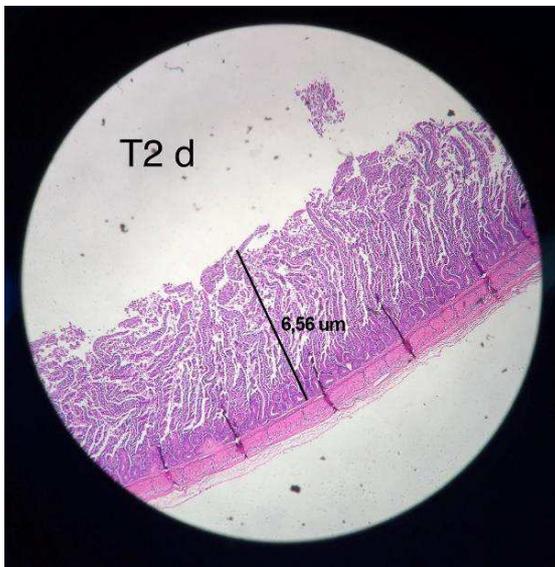
Medición de microvellosidades Día 42

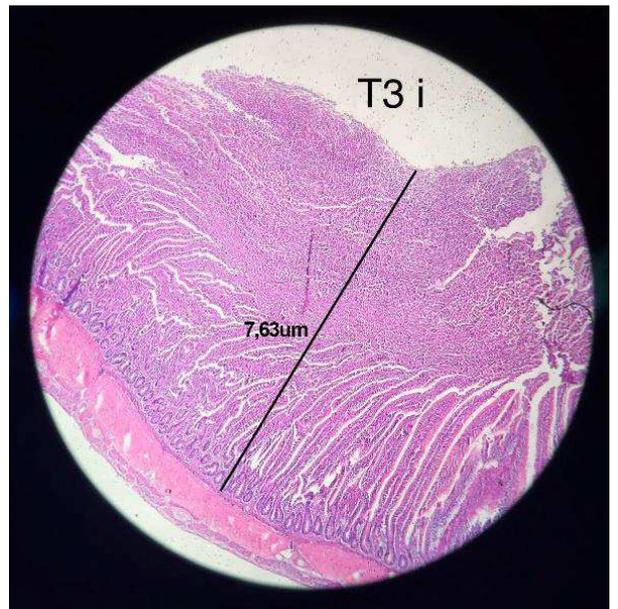
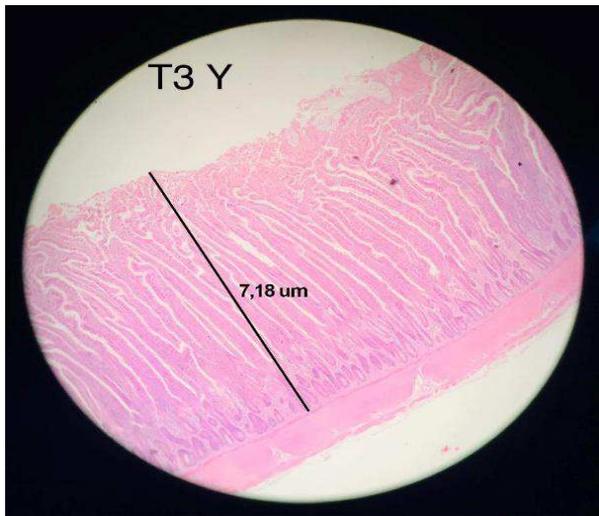
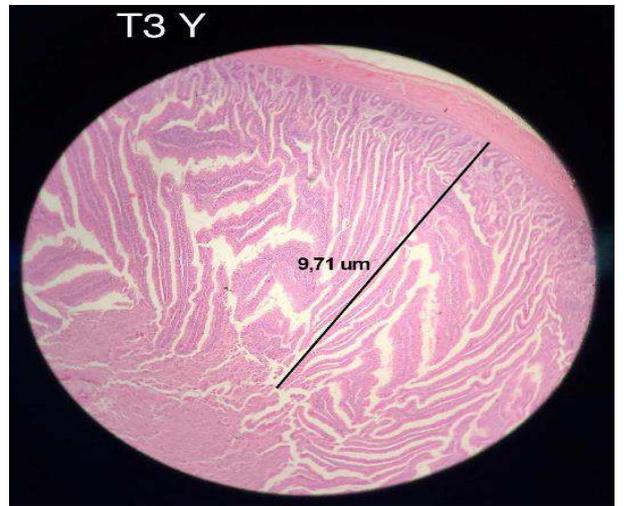
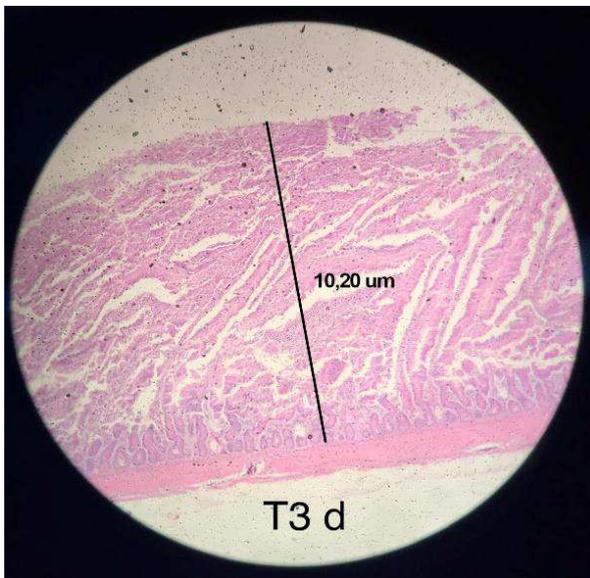
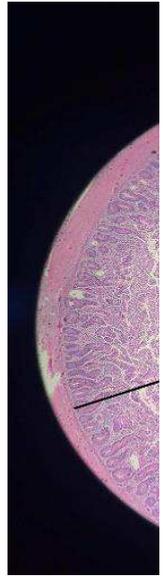
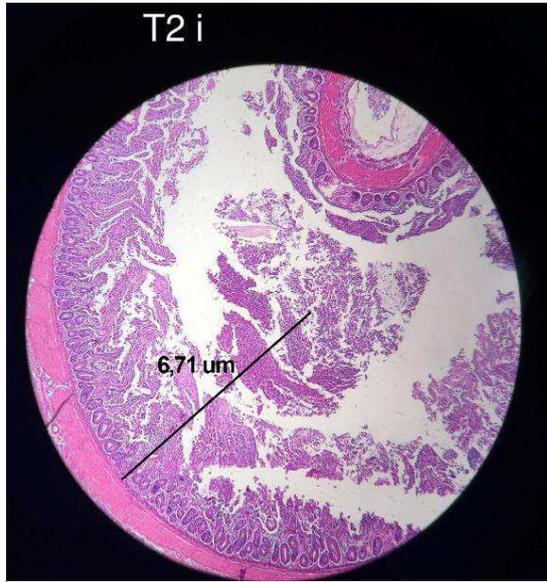
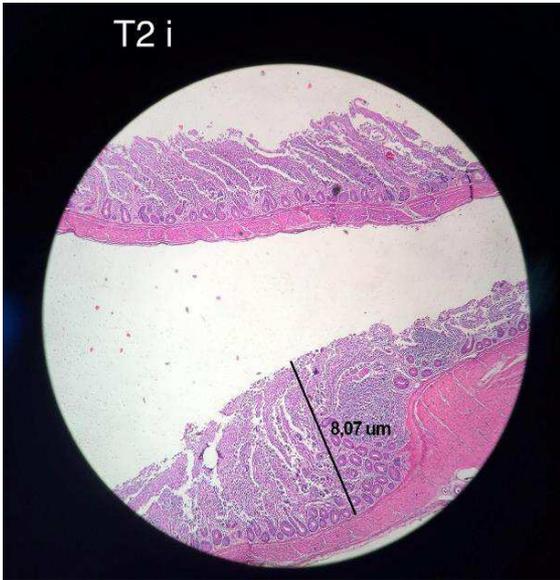
Planos

Redondos

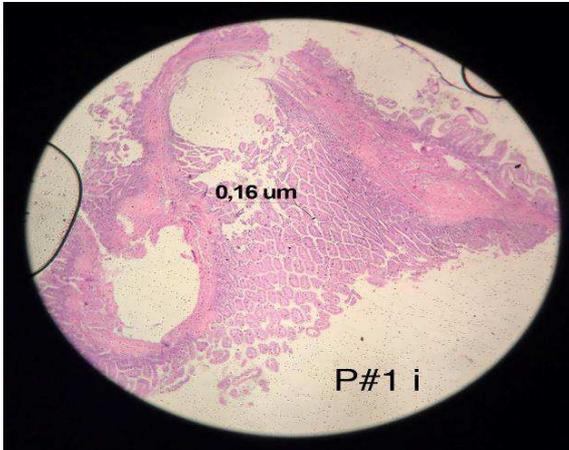






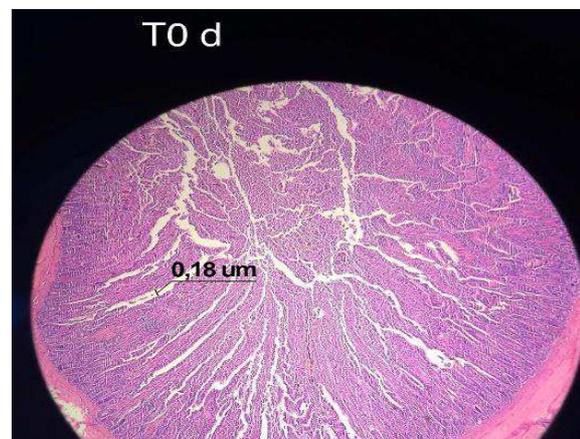
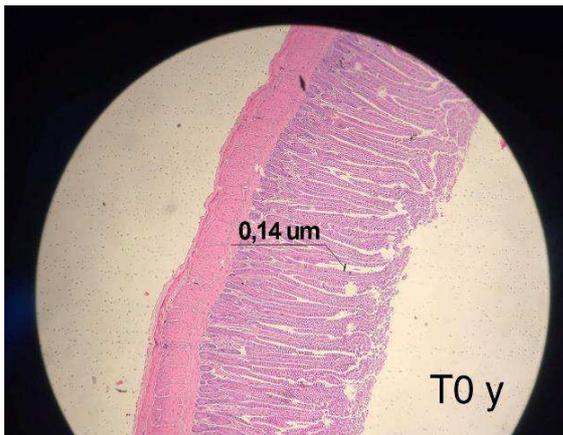
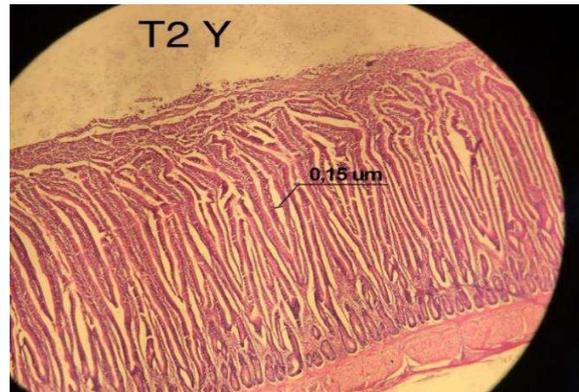
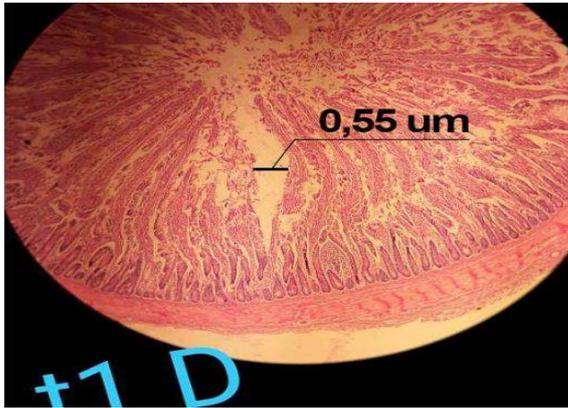


8.6 Imágenes de la medición de grietas entre microvellosidades con relación a una micra del tejido.



El día 0 del pollito muestra microvellosidades pequeñas 4.94μm por ende las grietas también son pequeñas como observamos 0.16 μm

En el día 14 las microvellosidades crecen unas cuantas micras (T1d) 5.41μm con amplio espacio 0.55 entre grietas y (T2y) 7.67μm considerado buen crecimiento con 0.15μm entre grietas ya que no se separan mucho es considerado bueno.



9. Conclusión

Ya culminado el proceso de pruebas y obtenidos los resultados, comparamos la tabla 1 con la tabla 2 y sacamos la conclusión de que las *Salmonella* y *E. coli* en el ciego de los pollos no se eliminan por completo. Un pollo sin tratamiento aumentaría un 22% de *Salmonella* mientras que con probiótico T1 disminuyó un 35,5% y el T3 42,6%. En la *E. coli* identificando población de bacterias desde el día 14 al 42 disminuyó un 2% mientras que con *Bacillus subtilis* T2 disminuye un 6% y T3 un 7%.

El tracto respiratorio muestra bacterias comunes como *Staphylococcus*, estos están presentes en las mucosas tanto animal como en humanos. Como dato el T1 -13 reflejó la cantidad más baja de colonias 56 UFC seguido del T3 – 11 con 74 UFC. Si hiciéramos una media entre las concentraciones por tratamiento el T2 = 172 UFC sería el más alto seguido del T3 =166 UFC; T1=147 UFC y T0 =124 UFC.

El sistema gastrointestinal de las aves mejoro notablemente el día 42 con el T2 10^8 pero más con el T3 10^{10} reflejando mayor número de leucocitos, hematíes y picoitos, mejor color y aspecto de las heces es decir más glóbulos rojos y blancos.

El antibiograma reflejo que el *Trimethoprim/Sulphamethoxazole* es sensible a la *Salmonella* y resistente al *E. coli*; La Amoxicilina es sensible a la *Salmonella* y media para *E. coli*; el Chloranphenicol es sensible a la *Salmonella* y resistente para *E. coli*; La Oxytetraciclina es resistente al *E. coli* y *Salmonella*; La Ampicilina es resistente al *E. coli* y media a la *Salmonella*.

Mediante los cortes histológicos, se puede observar que un pollo sin probiótico no desarrolla sus microvellosidades al máximo más bien decae y esto causaría perdida en la conversión para el pollo y perdida de dinero para el inversionista, recalcando que los tratamientos con *Bacillus subtilis* obtuvieron mejor crecimiento de microvellosidades desde el duodeno, yeyuno hasta el ileon.

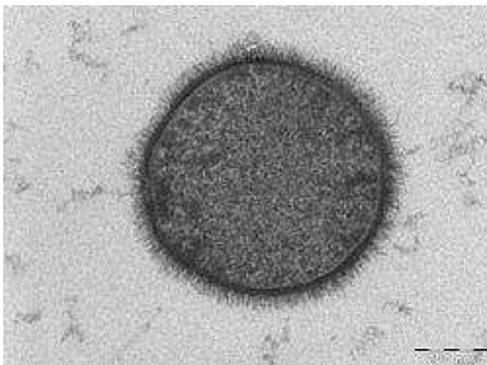
10. Recomendaciones

Podemos reducir un 42,6% la población de *Salmonella* y equilibrar un 7% de *E. coli* con una concentración recomendada de 10^{10} . Aplicada en el tratamiento 3.

Para el tracto respiratorio y sistema gastrointestinal sin duda el *Bacillus subtilis* beneficiaría a los pollos. Recomendando el T3, 10^{10} con mayor eficacia, siempre y cuando de la mano de una buena asepsia.

El mal uso de antibióticos puede causar resistencia a patógenos, de los fármacos utilizados en esta investigación el único que puede combatir la *Salmonella* y *E. coli* juntas con mejores resultados es la Amoxicilina.

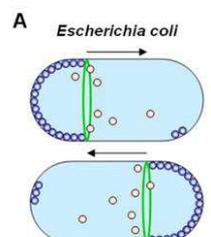
Para tener mejores resultados de microvellosidades y menos espacios entre grietas se recomienda una dosificación de 10^{10} hasta el día 42 para tener mejor resultado en el duodeno 51,3% yeyuno 6,8% e íleon 54,5%.



Bacillus Subtilis

41

11. Anexos.



B

SISTEMA DIGESTIVO DEL POLLO

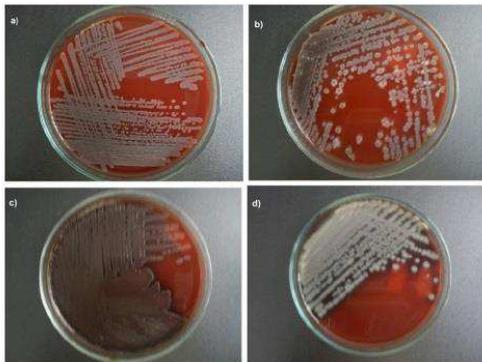
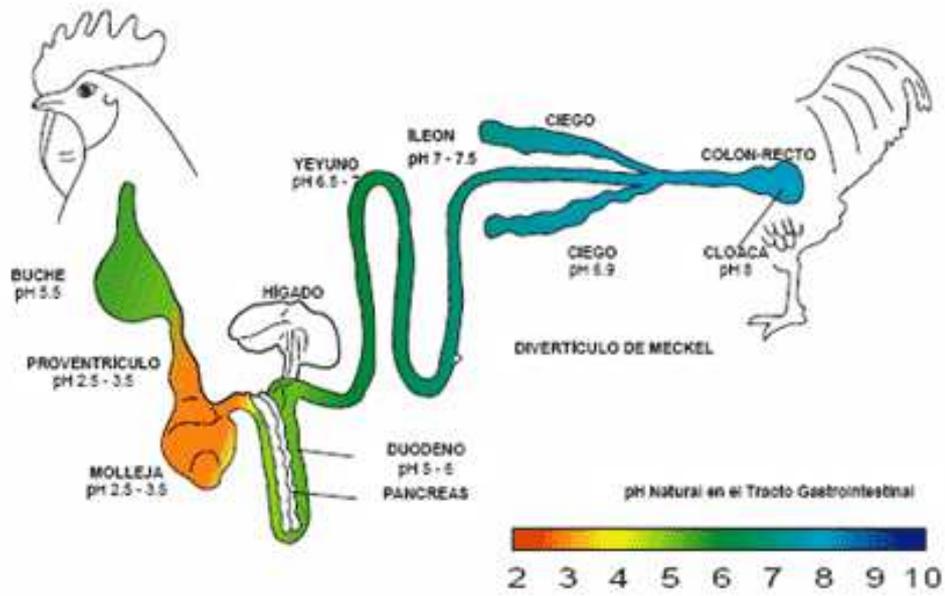
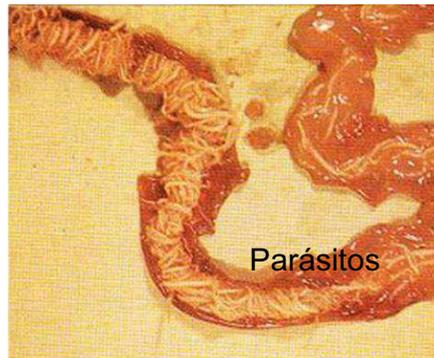


Figura 1. Cultivo de especies de *Bacillus* en Agar Sangre. a). *B. licheniformis*, b). *B. subtilis*, c). *B. pumilus* y d). *B. cereus*.

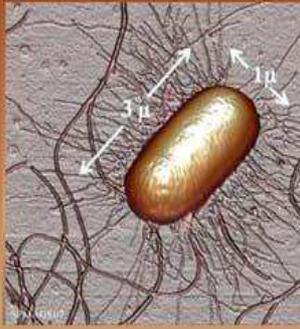


Infecciones Sistémicas Producidas por *E. coli*.



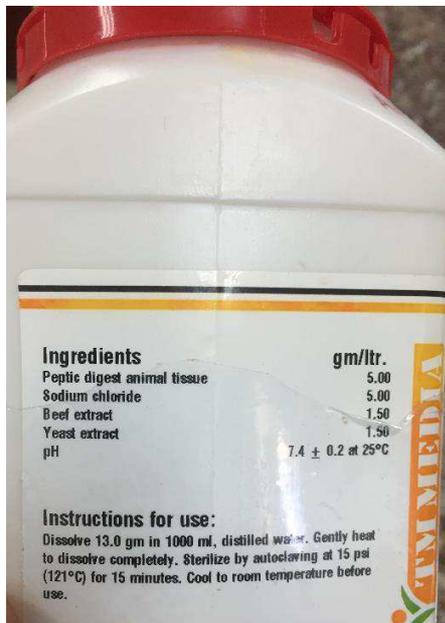
Escherichia Coli

1 cm	10 mm
1 mm	1000 μ
1000 μ	1000 mm
1mm	10 amstr og Å

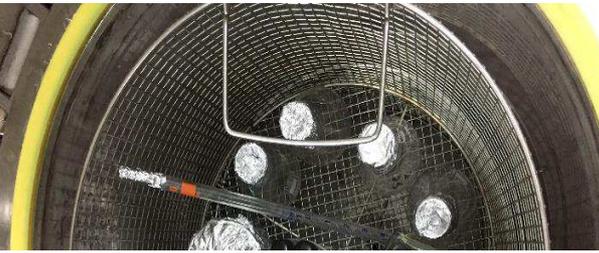


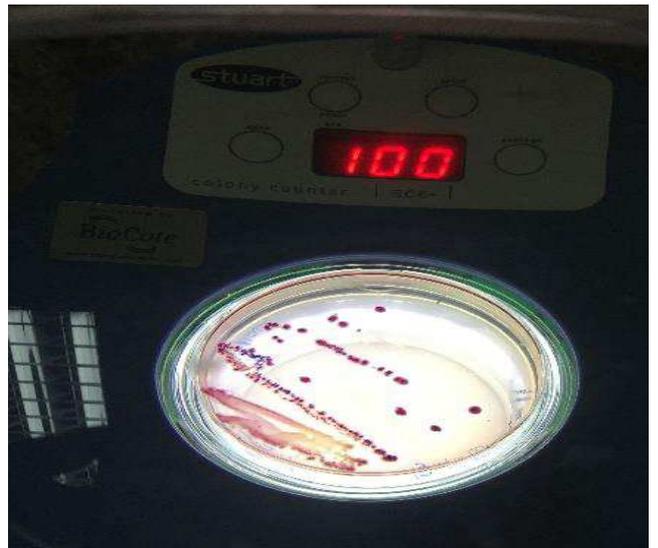
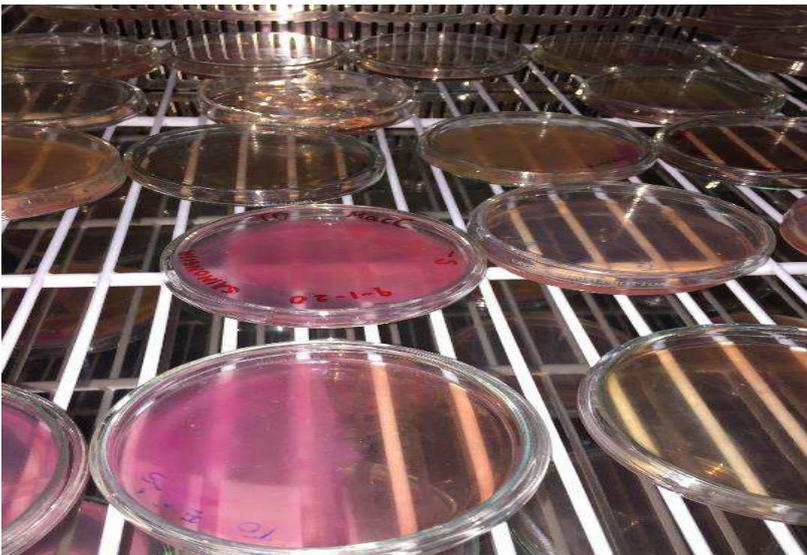
mm = Milimetro
 μ = Micro
 mm = Nanometro
 Å = Amstr og

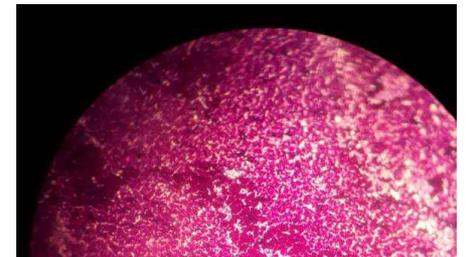
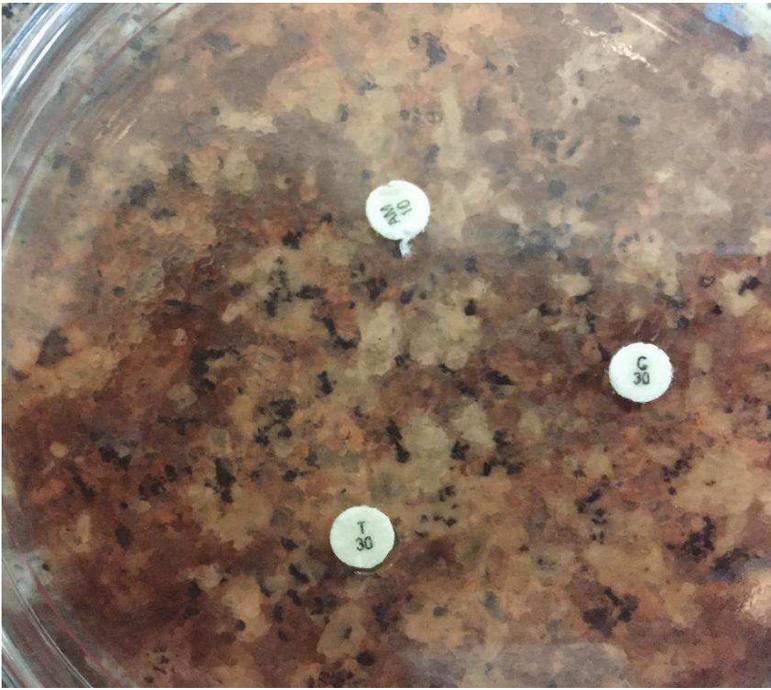
Ascariasis

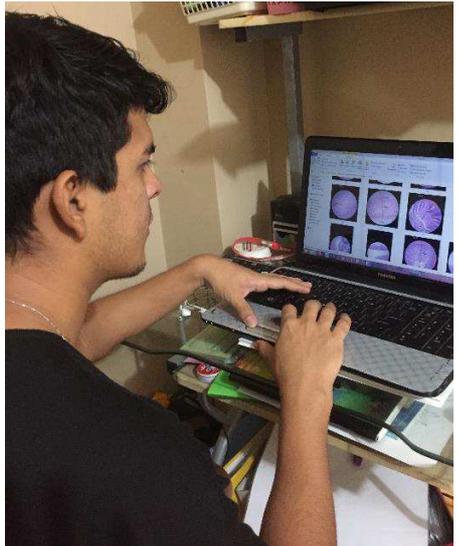
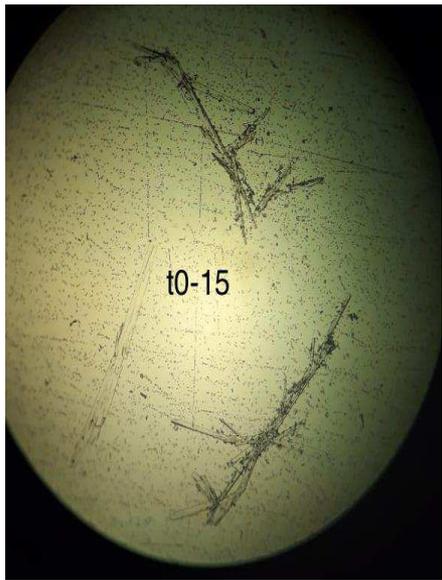
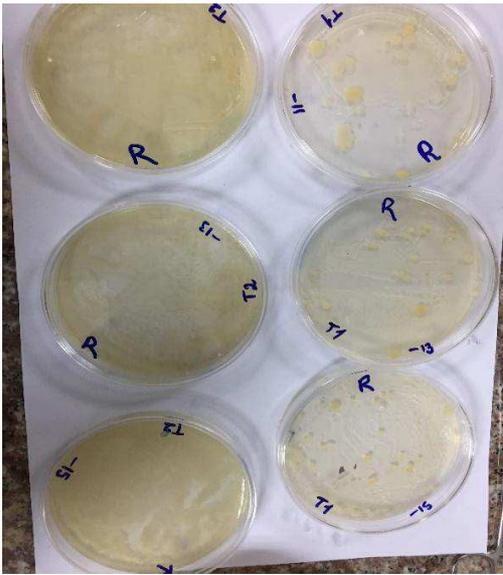
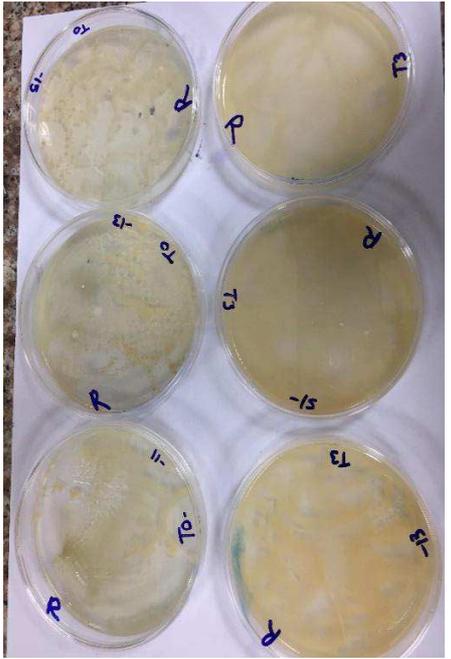
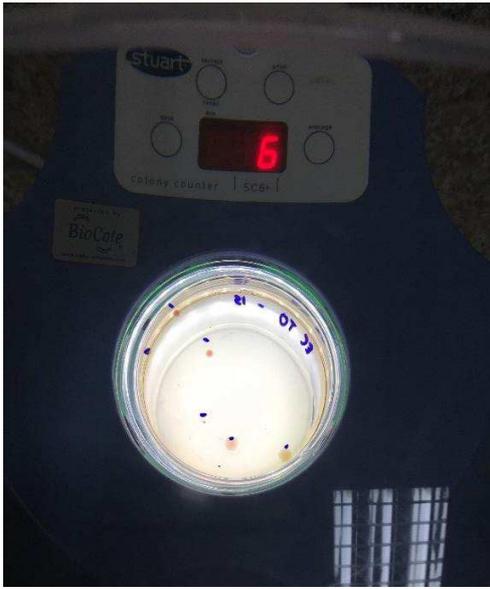
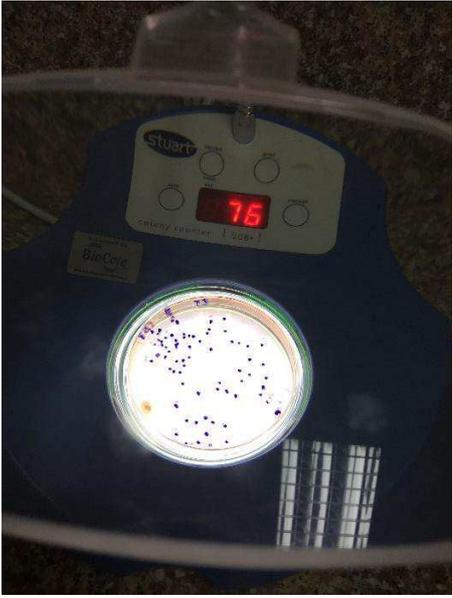


¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.









12. Bibliografías

(Sofiacult. 2017) - Alimentos Probióticos-
<http://sofiaylaciencia1.blogspot.com/2017/06/alimentos-probioticos-los-alimentos.html>

(Leidy Marcela. 2010) - Generalidades del *Bacillus subtilis*-
<http://bacillus8.blogspot.com/2010/04/bacillus-subtilis-clasificacion.html>

(Juan Carlos Aguavil Enríquez. 2012) "Evaluación del efecto de un probióticos nativo elaborado en base a *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* sobre el sistema gastrointestinal en pollos broiler ross-308 en santo domingo de los Tsáchilas." - <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5213/1/T-ESPE-ASA%20II%20-%20002399.pdf>

(Wikipedia 2017) – Generalidades https://es.wikipedia.org/wiki/Bacillus_subtilis

(Abanico vet vol.7 no.3 Tepic sep./dic. 2017) - *Bacillus subtilis* como probióticos en avicultura: aspectos relevantes en investigaciones recientes - http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-61322017000300014

Wikipedia 2017 – Alimentos Probióticos - https://es.wikipedia.org/wiki/Alimento_probi%C3%B3tico

(Héctor G. Barnés. 2014) - Pollos y antibióticos: una investigación sacude la industria alimentaria de EEUU - https://www.elconfidencial.com/alma-corazon-vida/2014-09-19/pollos-y-antibioticos-una-investigacion-sacude-la-industria-alimentaria-de-eeuu_199122/

Pedro Ródenas - Los antibióticos destruyen las bacterias nocivas y también las beneficiosas. Para compensar las pérdidas, es necesario tomar probióticos siempre. - http://www.cuerpomente.com/salud-natural/terapias-naturales/acompanar-probioticos-antibiotico_1313

(Medina-Saavedra et al. 2017) *Bacillus subtilis* como probióticos en avicultura: aspectos relevantes en investigaciones recientes - <http://www.medigraphic.com/pdfs/abanico/av-2017/av173b.pdf>

(Elvis Díaz et al. 2017) Probióticos en la avicultura - <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n35/0122-9354-rmv-35-00175.pdf>

(SAG. 2016) - Salmonelosis Aviar en pollos de engorde - https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/f_tecnica_salmonelosis_aviar_v2-2016.pdf

(Vásquez, 2011) *E. coli* en pollos de engorde - <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/escherichia-coli-patogeno-aviar-t28854.htm>

(Carranza et al 2012) *E. coli* en pollos de engorde - <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v23n2/a11v23n2.pdf>

Enfermedades Gastrointestinales en pollos de engorde -

http://www.agrobit.com.ar/Info_tecnica/alternativos/avicultura/AL_000016av.htm

Romero - Enfermedades Gastrointestinales en pollos de engorde -

http://www.agrobit.com/Documentos/I_1_1_avicultu%5C262_mi000003av11.htm

(Martínez, Sanz. 2016) – Infecciones respiratorias en pollos de engorde - https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1164027007a.pdf

(Torrubia, 2016) Infecciones respiratorias en pollos de engorde - <https://avicultura.com/interacciones-respiratorias-en-pollos-de-engorde/>

(Wikipedia. 2019) – Cultivo - [https://es.wikipedia.org/wiki/Cultivo_\(microbiolog%C3%ADa\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Cultivo_(microbiolog%C3%ADa))

(SEQC. 2017) – Antibiograma - <https://labtestsonline.es/tests/antibiograma>

12. Bibliografía de fotos.

Sistema digestivo del pollo- https://www.google.com.ec/search?biw=1366&bih=632&tbm=isch&sa=1&ei=NrlrWu_jiF42ZzwKQv7OIDw&q=SISTEMA+DIGESTIVO+DEL+POLLO+ph&oq=SISTEMA+DIGESTIVO+DEL+POLLO+ph&gs_l=psy-ab.3...36183.36722.0.37705.3.3.0.0.0.155.299.0j2.2.0...0...1c.1.64.psy-ab..1.1.154...0j0i30k1j0i5i30k1j0i24k1.0.qWcYfhAqzbE#imgrc=b0lxtSTmdt9NxM:

Formulas- <http://www.elsitioporcino.com/articles/2708/calculos-simples-conversian-de-alimentos-ganancia-diaria-de-peso-y-mortalidad/>

Multiplicación de *Bacillus subtilis* - https://www.google.com.ec/search?biw=1280&bih=918&tbm=isch&sa=1&ei=d2-AWtnDAqWZjwSS2K34Aw&q=multiplicacion+de+bacillus+subtilis&oq=multiplicacion+de+bacillus+subtilis&gs_l=psy-ab.3...9643.18345.0.18559.35.24.0.11.11.0.168.2676.0j18.18.0...0...1c.1.64.psy-ab..6.22.1670...0j0i67k1j0i30k1j0i8i30k1j0i24k1.0.vlxUWDxShV4#imgrc=hZ0ABpxmEyYL2M:

Bacillus subtilis - <http://bacillus8.blogspot.com/2010/04/bacillus-subtilis-clasificacion.html>

Enfermedades tracto digestivo-

https://www.google.com/search?q=%E2%80%A2+Muestra+de+ciego+para+parasitos+intestinales+en+pollos&sxsrf=ACYBGNSRJPjNNiPwA1wMDD1QKwcES_cnqQ:1571319335070&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=kh2AXWNBwvGy8M%253A%252C4lwyB7jfZ-QMsM%252C_&vet=1&usg=AI4_-kRn1HOMasfuJ1-2WuYn4Y1ulbHiew&sa=X&ved=2ahUKEwiplq7WtKPIAhXizVkkHfAoDq4Q9QEwCnoECAgQCQ#imgrc=kh2AXWNBwvGy8M:&vet=1

Infecciones Sistémicas producidas por *E. coli* -
<http://www.elsitioavicola.com/publications/6/enfermedades-de-las-aves/243/infecciones-por-escherichia-coli/>

Ascariasis -
https://www.google.com/search?q=parasitos+gastrointestinales+en+pollos+de+engorde&client=firefox-b&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=XDY3-Farlh0eeM%253A%252CgGCIVnCKzd-ZYM%252C_&vet=1&usg=AI4_-kS6cJ78Vq2YBHAzGTZU9-U-Lo_vQw&sa=X&ved=2ahUKEwj789_4t7jIAhWEjFkKHfTkDv4Q9QEwDnoECAcQDA#imgrc=XDY3-Farlh0eeM:

Coccidiosis -
https://www.google.com/search?q=parasitos+gastrointestinales+en+pollos+de+engorde&client=firefox-b&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=XDY3-Farlh0eeM%253A%252CgGCIVnCKzd-ZYM%252C_&vet=1&usg=AI4_-kS6cJ78Vq2YBHAzGTZU9-U-Lo_vQw&sa=X&ved=2ahUKEwi789_4t7jIAhWEjFkKHfTkDv4Q9QEwDnoECAcQDA#imgrc=OdYwaG1oqRHkxM:&vet=1