

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**  
**FACULTAD DE ZOOTECNIA**



**“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACTINOMICETOS  
AISLADOS DEL TRACTO DIGESTIVO DE GALLINAS CRIOLLAS”**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE  
INGENIERO ZOOTECNISTA**

**CLAUDIA HERLINDA RAMOS LAMA**

**LIMA- PERÚ**

**2019**

---

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente tesis (Art. 24 -  
Reglamento de Propiedad Intelectual)**

## DEDICATORIA

A Dios, a mis padres Angel y Ana por su infinito amor y apoyo, a mis hermanos Rafael, Angel y Adan, sin ellos no lo hubiese logrado. A mi abuela Dora por ser mi ejemplo de mujer y siempre creer en mí.

## AGRADECIMIENTOS

Al Concejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por su apoyo en el financiamiento de esta tesis, a través del proyecto con convenio N° 148 – 2017 – FONDECYT.

## AGRADECIMIENTOS

- Un especial agradecimiento a mi patrocinadora Aída del Carmen Cordero Ramírez, por su confianza y enseñanzas en todo este camino.
- Un especial agradecimiento a mi co- patrocinadora Dina Heidi Horna Inga, por su confianza y enseñanzas en todo este camino.
- A La Universidad Nacional Agraria la Molina y la Facultad de Zootecnia por permitirme utilizar sus instalaciones para del desarrollar parte de la presente investigación.
- A la empresa Ilender por permitirme utilizar sus instalaciones para concluir el desarrollo de la presente investigación.
- Al Doctor Carlos Sialer Guerrero, por sus sabios conocimientos y motivación en el desarrollo del presente trabajo de investigación.
- Al Médico Veterinario Daniel Molina Meza, por sus grandes consejos y enseñanzas.
- A la Médico Veterinario Sandra Espinoza Cabello por sus consejos, apoyo, confianza y gran amistad.
- A Carmen Arribasplata por su confianza y amistad.
- A Anthony Williams Vargas Zambrano, por su paciencia e infinito cariño.
- A mi familia por la fortaleza que me brindan.

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA

FACULTAD DE ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN

“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACTINOMICETOS AISLADOS DEL  
TRACTODIGESTIVO DE GALLINAS CRIOLLAS”

Presentada por:

CLAUDIA HERLINDA RAMOS LAMA

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERO ZOOTECNISTA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado

---

Ing. Marcial Cumpa Gavidia  
PRESIDENTE

---

Dra. Doris Elizabeth Zúñiga Dávila  
MIEMBRO

---

M.V. Daniel Zárate Rendón  
MIEMBRO

---

M.V. Aída Del Carmen Cordero Ramírez  
PATROCINADORA

---

Dra. Dina Heidi Horna Inga  
CO-PATROCINADORA

## ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	Objetivo general .....	2
1.2	Objetivos específicos .....	2
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1	Sistema de crianza de aves de traspatio.....	3
2.2	Gallinas criollas .....	4
2.3	Estructuras anatómicas del aparato digestivo en las aves.....	5
2.4	Desarrollo de la microbiota intestinal del ave .....	8
2.5	Factores que afectan la salud intestinal en el ave .....	10
2.6	Antibióticos promotores de crecimiento.....	11
2.7	Probióticos .....	12
2.8	Actinomicetos .....	13
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
3.1	Localización y fecha .....	18
3.2	Material biológico.....	19
3.3	Materiales y equipos de laboratorio.....	20
3.3.1	Medios de cultivo.....	20
3.3.2	Soluciones.....	20
3.3.3	Materiales.....	20
3.3.4	Equipos de laboratorio .....	20
3.4	Métodos .....	21
3.4.1	Toma de muestras .....	21
3.4.2	Aislamiento de actinomicetos .....	21

3.4.3	Identificación de los actinomicetos.....	25
a.	Caracterización macroscópica .....	25
b.	Caracterización microscópica .....	25
c.	Caracterización bioquímica .....	27
3.4.4	Determinación del efecto de granos andinos sobre la producción de esporas de actinomicetos .....	29
3.4.5	Determinación de la actividad antagónica .....	29
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
4.1	Toma de muestras y aislamiento de actinomicetos .....	30
4.2	Identificación de actinomicetos .....	31
4.2.1	Caracterización macroscópica .....	32
4.2.2	Caracterización microscópica .....	44
4.3	Caracterización bioquímica .....	56
4.4	Determinación de la afinidad metabólica del efecto de granos andinos sobre la producción de esporas de actinomicetos .....	58
4.5	Determinación de la actividad antagónica.....	60
V.	CONCLUSIONES .....	62
VI.	RECOMENDACIONES .....	63
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
VIII.	ANEXOS .....	80

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características microscópicas de actinomicetos aislados del tracto gastrointestinal de gallinas criollas .....	45
Tabla 2: Cantidad de cepas que presentaron esporulación sobre diferentes medios de cultivo .....	59
Tabla 3: Contenido de azúcares en los granos andinos (g/100 g materia seca) .....	59
Tabla 4: Resultados de enfrentamientos de enterobacterias contra Actinomicetos .....	61



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Morfología de estructuras portadoras de esporas .....	17
Figura 2: Mapa de ubicación de distrito de Querocoto, provincia de Chota Cajamarca.....	18
Figura 3: Proceso de aislamiento de colonias de actinomicetos .....	23
Figura 4: Procedimiento del aislamiento de colonias de actinomicetos .....	24
Figura 5: Proceso de técnica de tinción Gram .....	26
Figura 6: Método para la observación al microscopio de los micelios y forma- ción de propágulos de los actinomicetos .....	27
Figura 7: Proceso de realización de pruebas bioquímicas .....	28
Figura 8: Porcentaje de cepas aisladas del tracto gastrointestinal de gallinas criollas y heces .....	31
Figura 9: Características macroscópicas de cepas de actinomicetos .....	38
Figura 10: Porcentaje de las cepas de actinomicetos basado en la textura .....	39
Figura 11: Porcentaje de las cepas de actinomicetos basado en la coloración de de micelio de sustrato .....	40
Figura 12: Porcentaje de las cepas de actinomicetos basado en la coloración de micelio aéreo .....	41
Figura 13: Porcentaje de las cepas de actinomicetos basado en la producción de pigmento difusible .....	42
Figura 14: Porcentaje de las cepas de actinomicetos basado en la coloración de pigmento difusible .....	43
Figura 15: Porcentaje de las cepas de actinomicetos basado en pruebas bioquí- micas .....	57
Figura 16: Porcentaje de cepas de actinomicetos que presentaron crecimiento (%) .....	58
Figura 17: Zonas de transparencia o halos de inhibición contra <i>S. aureus</i> por parte de los aislamientos P009 (A), P025 (B), P041 (C) y P038 (C), que presentaron la mejor eficiencia de antagonismo .....	61

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Características de las aves consideradas para el estudio .....	81
Anexo 2: Proceso de necropsia y toma de muestra .....	82
Anexo 3: Coloración de micelio de actinomicetos .....	83
Anexo 4: Coloración de micelio de actinomicetos .....	84
Anexo 5: Composición y preparación de medios de cultivo .....	85
Anexo 6: Composición de medios de cultivo sólidos en base a quinua, kiwicha, kañihua y maíz .....	87
Anexo 7: Características macroscópicas de actinomicetos aislados del tracto digestivo de gallinas criollas .....	88
Anexo 8: Pruebas bioquímicas realizadas a cepas de actinomicetos .....	89
Anexo 9: Principales hallazgos obtenidos durante las necropsias de las gallinas...	93
Anexo 10: Crecimiento y esporulación de cepas de actinomicetos aislados de gallinas criollas .....	92
Anexo 11: Cepa control CS080 <i>Streptomyces lividans</i> .....	93

## RESUMEN

En el presente estudio, se identificaron y caracterizaron los actinomicetos aislados del tracto digestivo de gallinas "criollas", evaluando sus características culturales (macroscópicas), micromorfológicas y fisiológicas de estas actinobacterias junto con sus actividades antimicrobianas. El muestreo de 10 gallinas se realizó en el mes de julio de 2018 de la comunidad de Chota Cajamarca. La selección inicial se realizó en el medio agar avena y otros medios comerciales para el crecimiento y el aislamiento de cepas de actinomicetos. De las cuales se aislaron 31 cepas (74 por ciento) del ciego, 3 cepas (7 por ciento) de la cloaca y 2 cepas (5 por ciento) del íleon. A través de sus propiedades fenotípicas, se identificaron 42 cepas de actinomicetos, para lograr diferenciarlas se consideraron características macroscópicas como la textura, el color del micelio del sustrato, el color del micelio aéreo, la presencia de pigmento difusible y la coloración del pigmento difusible; donde las características por textura en pulvurulenta con un 81 por ciento, color de micelio de sustrato verduzco con 36 por ciento, color de micelio aéreo verde con 24 por ciento, presencia de pigmento difusible con 69 por ciento y coloración del pigmento difusible verdoso 29 por ciento. La caracterización microscópica, se realizó a través del método de la laminilla insertada en un ángulo de 45° en el medio de cultivo, así las cepas de actinomicetos fueron examinadas micromorfológicamente; en donde fue posible visualizar el crecimiento del micelio aéreo y el sustrato de los actinomicetos. Estas observaciones por microscopía de luz mostraron que el 93 por ciento de las 42 cepas aisladas de actinomicetos podrían identificarse como pertenecientes al género *Streptomyces* spp.; mientras que el 7 por ciento restante, representado por las cepas P024, P032 y P042, se identificaron dentro del género *Nocardia* spp.

**Palabras claves:** Gallinas criollas, actinomicetos, micelio de sustrato, micelio aéreo, granos andinos.

## ABSTRACT

Actinobacteria were identified and characterized, evaluating the cultural (macroscopic), micro-morphology and physiological characteristics of these actinobacteria along with their antimicrobial activities. The sampling of 10 creole hens was carried out in the month of July 2018 of the community of Chota Cajamarca's. The initial screening was performed on oat agar medium and others commercial medium like Peptone agar for growth and isolate of actinomycetes strains. Of which 31 strains (74 percent) were isolated from the caecum, 9 strains (21 percent) of the cloaca and 2 strains (5 percent) of the ileum. Based on phenotypic properties, 42 isolated strains of actinomycetes were identified, for differentiation, macroscopic characteristics such as texture, substrate mycelial color, aerial mycelium color, presence of diffusible pigment and diffusible pigment coloration were considered; where the highest percentages characteristic was obtained by powdery texture with 81 percent, color of substrate mycelium with 36 percent, color of green aerial mycelium with 24 percent, the presence of diffusible pigment with 69 percent and the coloring of the diffusible pigment with greenish hue in 29 percent. For microscopic characterization, through cover-slip angle of 45° method on cultures medium, were micro-morphologically examined actinomycetes strains; from which it was possible to visualize the growth of the aerial mycelium and the substrate of the actinomycetes. These observations by light microscopy, showed that 93 percent of the 42 strains isolated of actinomycetes could be identified as belonging to the genus *Streptomyces*; while the remaining 7 percent, represented by the strains P024, P032 and P042, were identified inside the genus *Nocardia* spp.

**Keywords:** Creole hens, actinomycetes, substrate mycelial, aerial mycelium, andeans grains.

## I. INTRODUCCIÓN

Actualmente en la industria avícola se viene utilizando antibióticos, en su mayoría de síntesis química, no sólo con fines terapéuticos, sino como promotores de crecimiento en el alimento de las aves, para el tratamiento de animales sanos en forma preventiva o con el fin de mejorar la conversión alimenticia y fomentar su crecimiento. El uso prolongado e inadecuado de dichos antibióticos, muchos no regulados por la autoridad sanitaria, viene incrementando la aparición de resistencia antimicrobiana, disminuyendo su eficacia y efectividad. Además, esto ocasiona efectos negativos y residuales a los animales y a los seres humanos, siendo esta la causa de la búsqueda de nuevas fuentes de antibióticos de origen natural, el cual no genere resistencia y sea amigable con el medio ambiente.

Una de las principales fuentes de antibióticos de origen natural son las bacterias del grupo de los actinomicetos. Los actinomicetos son mayormente bacterias aerobias, algunas anaerobias, heterótrofas, por lo cual pueden utilizar fuentes de carbono simple, complejas y compuestos moleculares orgánicos (Franco, 2008). El gran interés industrial sobre los actinomicetos se debe a su gran potencial para producir una vasta variedad de metabolitos bioactivos como los antibióticos, obteniendo valores sobre el 60 por ciento de los antibióticos producidos. Uno de los géneros más importantes y con mayor producción de antibióticos, es el género *Streptomyces* (Loaiza *et al.*, 2013; Zotchev, 2012).

Su biodisponibilidad ubicua demuestra su capacidad de adaptación a diferentes ecosistemas, pero además le ha permitido evolucionar a un nivel superior de adaptación, conviviendo con otros seres vivos y generando mutualismos complejos. (Sialer, 2011). Por lo cual, teniendo en cuenta que las gallinas criollas en sistemas de crianza extensiva tienen como característica la exposición constante al medio ambiente, se facilitaría la interacción del hospedero con microorganismos del suelo, como los actinomicetos, por sus hábitos alimenticios y la disposición de los nutrientes de manera rústica y libre, enriqueciendo y seleccionando de esta manera la microbiota intestinal de las aves.

Por ello mediante la presente investigación se buscará actinomicetos en nuevas fuentes de aislamiento como el tracto digestivo de gallinas criollas, estos microorganismos serán aislados, identificados y caracterizados microbiológica y bioquímicamente.

### **1.1 Objetivo general**

Identificar y caracterizar actinomicetos provenientes del tracto digestivo de gallinas criollas.

### **1.2 Objetivos específicos**

- Aislar actinomicetos del contenido intestinal de gallinas criollas.
- Identificar macroscópica y microscópicamente actinomicetos del tracto digestivo de gallinas criollas.
- Caracterizar bioquímicamente los actinomicetos del tracto digestivo de gallinas criollas y evaluar su afinidad metabólica a diversos sustratos como quinua, kiwicha, cañihua y maíz.
- Evaluar la capacidad antagónica de los actinomicetos frente a bacterias patógenas indicadoras y bacterias aisladas de muestras clínicas de pollos de engorde.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Sistema de crianza de aves de traspatio

En los sistemas de producción extensivos se considera la crianza de traspatio, en donde las aves son explotadas con las mínimas prácticas de manejo. La crianza de aves de traspatio es una actividad importante en las comunidades rurales de países en desarrollo. Dentro de las especies animales que se explotan bajo este sistema, las gallinas son las más importantes, ya que sus productos se destinan principalmente al autoconsumo (Villacís, 2016). Comparándolas con aves mejoradas genéticamente, las gallinas de origen criollo se caracterizan por su rusticidad, gracias a ella son capaces de resistir a las variaciones ambientales y de alimentación, además de poseer una alta resistencia a enfermedades, es decir, crecen y se reproducen buscando su propio alimento, antibióticos, ni suplementos vitamínicos (Palomino, 2015).

En dicho sistema de crianza de traspatio, las aves se encuentran libres en los alrededores de la casa, sin barreras físicas como cercos que restrinjan su tránsito, es decir carecen de corrales y gallineros (Guevara, 2018). En este sistema, los animales deben ser encerrados por la noche para evitar pérdidas por robo o para que no sean devorados por sus depredadores naturales. Es en este espacio donde encuentran su alimento (por ejemplo, semillas, minerales, insectos y hierbas); y tienen nidos donde ponen y empollan los huevos, así como lugares para descansar y pernoctar (Villanueva *et al.*, 2015).

La avicultura de traspatio requiere de baja inversión y poco tiempo en su manejo y, en algunos casos, suministra a las aves maíz quebrado, masa de maíz y sobras de comida. El sistema tiene un bajo costo en mano de obra y alimento para las aves; lo cual se relaciona con los bajos indicadores de producción de huevos y carne, en comparación con los sistemas intensivos. La producción es baja, llegando a oscilar entre 60 y 65 huevos por gallina por año, ya que los animales consumen mucha energía al moverse en busca de alimento, no cubren sus requerimientos nutricionales para la producción y, en muchos casos, existe una limitación genética para el uso de aves criollas. (Villanueva *et al.*, 2015; Cisneros, 2002).

## **2.2 Gallinas criollas**

Las gallinas criollas se originan del cruce entre aves europeas, americanas modernas y asiáticas (FAO, 2003). En los países que conforman la región andina es usual encontrar gallinas criollas, las cuales fueron criadas por pequeños productores. Pueden mostrar diferencias en un determinado ámbito territorial, los mismos que se encuentran vinculados a particularidades de manejo, geografía, historia, socioeconomía y cultura; común denominador en el ámbito regional en el que se desarrollan. (Cisneros, 2002; Cauchos *et al.*, 2015).

La alimentación de las gallinas criollas está basada en granos producidos por los pequeños productores, restos de la alimentación propia de sus criadores y de todo aquello que puedan ingerir durante el pastoreo (hierbas, insectos y pequeñas piedrecillas), beben agua de fuentes naturales y carecen de corrales que los protejan de depredadores; adicionalmente, en algunos casos los campesinos optan por comprar alimentos de fórmulas comerciales para incrementar el peso de las aves o cuando su producción de pasto y grano es escasa. Su rusticidad (resistencia a enfermedades y adaptación al medio), productividad y fácil manejo las hacen un recurso genético local importante. (Narváez *et al.*, 2002; Juárez, 2001; Guevara, 2018).



### **2.3 Estructuras anatómicas del aparato digestivo en las aves**

El aparato gastrointestinal de las aves es responsable del almacenamiento del alimento, la secreción de enzimas y absorción de nutrientes (Murakami *et al.*, 1992). Es además uno de los principales mediadores del contacto con el medio externo del organismo, representa la principal vía de entrada de nutrientes, genobióticos, fármacos, toxinas etc., por lo cual cuenta en cada uno de sus segmentos con distintos mecanismos tanto de protección como de absorción y eliminación de moléculas (Sumano y Gutiérrez, 2010).

En la boca el ave carece de labios, paladar blando, mejillas y dientes, pero posee mandíbulas córneas superior e inferior que circundan la boca; la superior se encuentra unida al cráneo, mientras que la inferior es colgante (Marck, 2002). En la parte externa de la cavidad bucal se encuentra el pico, el cual constituye la principal estructura prensil en donde el alimento permanece por solo un instante (Sumano y Gutiérrez, 2010), el pico el cual puede variar dependiendo de la adaptación para diferentes estilos de alimentación. Las aves carecen de una distinción precisa entre la faringe y la boca (Denwod, 2015).

En las paredes de la cavidad bucal se hallan numerosas glándulas salivales, la saliva es segregada por la gallina adulta en ayunas en 24 horas varía entre 7 a 25 ml., siendo el promedio 12 ml. El color de la saliva es gris lechoso a claro; el olor, es pútrido. La reacción es casi siempre ácida, siendo promedio del pH 6,75. La amilasa salival está presente y también se encuentra una pequeña cantidad de lipasa (Masaquiza, 2012).

El esófago está ubicado a lo largo de la parte inferior del cuello, sobre la tráquea, dirigiéndose hacia el lado derecho en el tercio superior de éste para situarse en el tercio inferior en la derecha del cuello donde está cubierto solamente por piel, hasta su entrada a la cavidad torácica. Es amplio y dilatado, sirve para acomodar los voluminosos alimentos sin masticar. La pared esofágica consta de cuatro capas: mucosa, submucosa, túnica muscular y la capa serosa; generalmente contiene solo células musculares lisas, predominando una capa muscular circular (Sumano y Gutiérrez, 2010; Denwod, 2015).

El buche se origina con la dilatación del esófago, es una estructura expandible que permite el almacenamiento del alimento ingerido, además está interiormente cubierto de una capa de epitelio escamoso estratificado (Lorenzoni, 2010; Barragán, 2011). En él, las partículas de alimento se ablandan y la ptialina, proveniente de la boca, continúa hidrolizando los almidones. Se considera un órgano con escasa digestión por fenómenos de fermentación microbiana y cierta capacidad de absorción de glucosa y ácidos grasos volátiles (Angulo, 2009).

El proventrículo, también llamado estómago glandular, es donde se inicia la digestión de las proteínas, la secreción de ácido clorhídrico y de pepsinógeno por las células oxintopépticas. El pepsinógeno llega al lumen del proventrículo desactivado y entonces, por acción del ácido clorhídrico y por moléculas de pepsina activadas, ocurre el rompimiento de una determinada porción de su molécula, transformándolo en su forma activa (Sumano y Gutiérrez, 2010). Está situado a la izquierda del plano medio, en posición craneal con respecto al estómago muscular. Se estrecha poco antes de su desembocadura en el estómago muscular, constituye en gran manera un conducto de tránsito para los alimentos que proceden del buche y que parten hacia la molleja. En su exterior está recubierto por el peritoneo, formado por una túnica muscular, compuesta de una capa externa, muy fina, de fibras longitudinales y de otra interna, de fibras circulares. Su mucosa contiene glándulas bien desarrolladas las cuales son las encargadas de la secreción de ácido clorhídrico (HCl) y pepsina (Sumano y Gutiérrez, 2010).

En la molleja, la superficie inferior está cubierta por una cutícula que es producida por glándulas de la mucosa; esta cutícula protege la molleja del ácido y de las enzimas proteolíticas secretadas por el proventrículo y de lesiones durante la molienda de alimentos duros (Denbow, 2015). La molleja está cubierta en su extremo anterior por los dos lóbulos hepáticos y tiene un pH promedio de 4.06 (Aguavil, 2012). En este órgano se dan los fenómenos de mezcla del alimento con las secreciones gástricas y la saliva, también se realiza la digestión mecánica mediante la molienda; debido a las fuertes contracciones de la potente masa muscular de la misma, en aves que consumen granos de cereales, leguminosas, etc. En libertad suelen beneficiarse del grit insoluble que obtienen del suelo para facilitar la rotura de las estructuras vegetales (Lorenzoni, 2010; Angulo, 2009).

El intestino delgado se divide en duodeno, yeyuno e íleon. Se puede ubicar el divertículo de Meckel, el cual es usado a menudo como punto de referencia para separar el yeyuno y el íleon. La longitud intestinal varía considerablemente entre especies, siendo relativamente más cortos en frugívoros, carnívoros e insectívoros, y más largo en granívoros, herbívoros y piscívoros (Denwob, 2015). Además, en el intestino delgado se realiza la digestión química, y se involucran enzimas de origen pancreático e intestinal como: aminopeptidasa, amilasa, maltasa e invertasa, las secreciones endógenas permiten diluir el alimento del intestino, neutralizando también la acidez de este, mientras el moco y las inmunoglobulinas se adhieren a la mucosa intestinal y la protegen de agentes físicos y patógenos (Cuca y Ávila., 1996).

El íleon es una estructura estriada y se encuentra en el centro de la cavidad abdominal, posee un pH de 7,59. Cabe recordar que en el lumen intestinal la mucosa es extendida por la proyección de las vellosidades y más aún por las microvellosidades; a su vez cada vellosidad está recubierta por enterocitos responsables de la absorción y de la regeneración normal del tejido, siendo estos uno de los principales sitios de absorción de fármacos dado la gran superficie de contacto que ofrecen (Sumano, 2010). En cuanto a la microbiota intestinal, la concentración de bacterias que posee es de  $10^8$  UFC/g, siendo las especies predominantes correspondientes al género *Lactobacillus*, en primer lugar y luego a las familias *Clostridiaceae*, *Streptococcaceae* y *Enterococcaceae* (Blajman *et al.*, 2015).

El intestino grueso comprende los ciegos y recto. Los ciegos son el primer segmento del intestino grueso. La presencia de dos ciegos es típica en aves domésticas granívoras, pero se puede encontrar aves con ausencia de estos o solo disponer de uno más pequeño, está formado por tubos con extremidades cerradas, que tienen su origen por la unión del intestino delgado y del recto y se extiende cranealmente hacia el hígado (Sumano, 2010). Los ciegos tienen como función la absorción y la fermentación gástrica, produciendo principalmente ácido acético, propiónico y butírico; el pH del ciego derecho es de 7,08 mientras que el pH del ciego izquierdo es de 7,12 (Marck, 2002). La microbiota intestinal en el ciego cumple una importante función en la nutrición de las aves, debido a su participación en algunos procesos metabólicos y síntesis de nutrientes. Otra función está relacionada con la exclusión competitiva. Este término describe, un fenómeno biológico referido a una temprana colonización del tubo digestivo de las aves de la flora bacteriana normal y su posterior capacidad de impedir una

recolonización por bacterias enteropatógenas (Rosende y Juri, 1986). Los principales géneros bacterianos encontrados en las aves son: *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Geminger*, *Clostridium*, *Lactobacillus* o *Propionibacterium*, en concentraciones superiores a  $10^9$  UFC/g, pudiéndose observar *Staphylococcus*, *Streptococcus* o *Escherichia coli* en concentraciones de  $10^8$  UFC/g (Sumano, 2010). El colon y el recto son sitios en los que se realiza la absorción de agua y proteínas. Tienen un pH promedio de 7,38. Las dos últimas porciones del intestino grueso se han considerado como parte del recto (Sumano, 2010).

#### **2.4 Desarrollo de la microbiota intestinal del ave**

La microbiota es un complejo sistema ecológico. En las aves está conformada por una gran variedad de microorganismos aeróbicos y anaeróbicos, dentro de ellos se encuentran los patógenos y no patógenos, los cuales deben mantenerse en equilibrio para no alterar la salud del animal. Gracias al equilibrio que existe, las aves pueden desempeñar un máximo rendimiento en producción, pero, si se generan condiciones que produzcan estrés, la microbiota, especialmente tienden a disminuir en número, y a su vez aumenta el número de las bacterias patógenas; como consecuencia de la alteración de la eubiosis, se pueden producir enfermedades entéricas las cuales involucran virus, bacterias, agentes infecciosos y no infecciosos (Kabir, 2009; Yegani y Korver, 2008).

La microbiota bacteriana en las aves varía de acuerdo con diversos factores como la localización, la dieta y la edad del animal. Es por esta razón que existen diferentes investigaciones acerca de las composiciones taxonómicas (Clavijo, *et al.*, 2017). La diversidad de la microbiota se encuentra en todo el tracto digestivo y es mucho más extensa en el ciego (Amit-romach *et al.*, 2004). De acuerdo con Sansalone (2008), existen al menos 400 especies bacterianas en el tracto gastrointestinal de los cuales se conoce solamente el 15 por ciento. Está constituida en su mayoría por bacterias anaerobias facultativas como *Lactobacillus sp.*, *Enterococcus sp.*, y *Escherichia coli*, las cuales representan entre el 60 y 90 por ciento de la microbiota intestinal. Otras especies que se encuentran comúnmente en el íleon o el duodeno son los anaerobios obligados como eubacterias, clostridios, propionibacterias y fusobacterias (Días *et al.*, 2017).

Esta microbiota participa activamente de todos los fenómenos digestivos y nutricionales de las aves. Es por ello por lo que una alimentación adecuada y sin variaciones genera en el ave un impacto positivo sobre la absorción de nutrientes, el sistema inmune y la productividad, además el correcto equilibrio en la microbiota está genera la reducción y prevención de la colonización de patógenos entéricos (Clavijo, *et al.*, 2017).

Otra de las variantes anteriormente mencionadas es la edad del animal, durante una etapa temprana, luego de la eclosión, se da un periodo crítico para el establecimiento de la microbiota intestinal del ave. En un organismo animal sano, las superficies externas e internas están recubiertas por microorganismos que constituyen su microbiota natural. Se considera que el neonato es estéril durante la vida intrauterina, comenzando la colonización del tubo digestivo a las pocas horas del nacimiento a partir de la microbiota de la vagina, del intestino y de la piel de la madre, así como el ambiente general (Rosmini *et al.*, 2004; Lan *et al.*, 2005).

Según Barnes *et al.*, 1980 y Cole *et al.*, 1984, pudieron aislar en el día tres de la eclosión estreptococos y coliformes en todos los segmentos del tracto gastrointestinal. El establecimiento de estas bacterias en el intestino delgado es en aproximadamente dos semanas. Dicha microbiota bacteriana se encuentra limitada a estreptococos y coliformes durante los primeros 40 días, luego se establecen los *Lactobacillus* se establecen y dominan (Smith, 1965; Coloe *et al.*, 1984). En contraste, la microbiota cecal se establece a una edad de seis a siete semanas (Coloe *et al.*, 1984); dentro los microorganismos aislados en esta sección del tracto digestivo del ave se encontraron estreptococos, clostridios, enterobacterias, pediococos y *Pseudomona aeruginosa* (Lan *et al.*, 2005).

Cuando los animales se desarrollan en sistemas de producción tanto extensivos como en forma silvestre, la colonización del aparato digestivo ocurre en forma espontánea adquiriendo la microbiota del entorno que lo rodea. En un animal sano cada porción del intestino es colonizada por una microbiota que se adapta y desarrolla en una simbiosis benéfica con el hospedero (Rosmini *et al.*, 2004).

## 2.5 Factores que afectan la salud intestinal en el ave

El tracto digestivo del pollo es un área importante de exposición potencial a patógenos; el lumen normalmente contiene alimento y sus componentes, poblaciones microbianas bacterianas residentes y transitorias, nutrientes endógenos y secreciones del tracto digestivo y sus órganos accesorios como el hígado, la vesícula biliar y el páncreas. El tracto digestivo debe permitir selectivamente que los nutrientes crucen la pared intestinal hacia los órganos, a su vez previene que los componentes nocivos de la dieta crucen la barrera intestinal (Korver, 2006).

La salud intestinal depende del equilibrio de bacterias patógenas y no patógenas. Dicho equilibrio denominado eubiosis mejora la salud de las aves, ya que ayuda a proteger la salud intestinal. Dicha microbiota intestinal actúa como barrera natural contra las bacterias patógenas (Días *et al.*, 2017). Esta barrera está compuesta por componentes físicos, químicos, inmunológicos y microbiológicos (Yegani y Korver, 2008).

Existe una amplia gama de factores que afectan la salud intestinal del ave, como la dieta, agentes infecciosos, el medio ambiente y el manejo, los cuales generan un desequilibrio en la microbiota del tracto digestivo, perjudicando la tasa de crecimiento y la conversión alimenticia del ave (Hughes, 2005). Sin embargo, cuando se posee un tracto digestivo sano, a causa de un equilibrio en la microbiota intestinal, se pueden mejorar las funciones del tracto digestivo (Yegani y Korver., 2008).

En el equilibrio bacteriano, las bacterias benéficas (*Lactobacillus acidophilus*, *L. vulgaris*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *Bacillus* sp.), permiten una óptima integridad intestinal. Estas bacterias juegan un papel importante en el control de la microbiota, estimulando el desarrollo de la pared intestinal y fortaleciendo el sistema inmune contra enfermedades como la coccidiosis y el cólera aviar que afectan severamente la integridad intestinal (Granados, 2008). Dentro de las principales bacterias benéficas capaces de producir metabolitos secundarios con efectos positivos sobre la salud intestinal, se encuentran los actinomicetos como candidatos principales con capacidad de sintetizar nuevos antibióticos (Quiñones *et al.*, 2016).

## **2.6 Antibióticos promotores de crecimiento**

Los agentes antimicrobianos se usan ampliamente en el campo de la ciencia veterinaria, no solo para tratar o prevenir una enfermedad, sino también para promover el crecimiento y mejorar la eficiencia de alimentos en los animales destinados al consumo. La utilización de antibióticos de forma no terapéutica originó el término antibióticos promotores de crecimiento (APC) (Hughes, 2005).

Es sabido que los antibióticos han sido empleados en dosis sub terapéuticas durante décadas como APC y aunque hace más de 10 años ha sido restringido su uso en la Comunidad Europea y varios países del Asia, aún sigue siendo una práctica aceptable para mejorar la producción animal como lo es en Latinoamérica. La entrada en rigor de las normas prohibitivas en Europa para el uso de antibióticos en la dieta para promover el crecimiento de los animales tiene un impacto global significativo, ya que, la Unión Europea también exige que los productos animales importados para consumo humano cumplan con el mismo reglamento (Molina, 2018). Actualmente la Comisión de la Unión Europea remite una propuesta en la que se busca alternativas naturales que cumplan dos requisitos fundamentales: ser eficaces y seguras, es decir, que ejerzan un efecto positivo sobre la producción animal y eliminar el riesgo para la salud humana, la salud animal y el medio ambiente (Gamarra, 2017).

La prohibición de los antibióticos como promotores de crecimiento se debió en gran medida a las sospechas de que su uso tendría relación al desarrollo de resistencia en bacterias patógenas. Diversos estudios encontraron vinculación entre casos graves de enfermedades gastrointestinales en humanos y bacterias resistentes a los antibióticos aisladas de granjas comerciales de animales. Lo cual se suma al desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos como consecuencia de la alta concentración de residuos de antibióticos en sistemas hospitalarios y prácticas agrícolas (Davies y Davies, 2010).

En la actualidad la prohibición del uso de antibióticos promotores de crecimiento (APC) tendrá importantes implicaciones económicas en el sector zootécnico, ya que conllevará un aumento de los costos de producción. En nuestro país, se ha estimado que la prohibición del

uso de APC puede provocar un aumento global de los costos de producción entre el 3,5 y el 5 por ciento, según la producción considerada (Gamarra, 2017).

## 2.7 Probióticos

Originalmente la palabra probióticos se usaba para describir sustancias producidas por un protozoo que se estimulaba por otro, pero luego se utilizó para describir suplementos alimenticios para animales que tenían un efecto beneficioso sobre el animal huésped al afectar su flora intestinal (Kabir, 2009). En la actualidad, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2001) redefinió el término probiótico, como “microorganismo vivo que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud”.

El empleo de probióticos en las aves está encaminado a mejorar el balance microbiano del tracto digestivo, inhibir el crecimiento de bacterias dañinas, producir enzimas para mejorarla utilización de alimentos y como resultado final, mejorar los rendimientos productivos. Los probióticos usados en la industria avícola, son una alternativa natural frente a los APC, y pueden estar formados por un solo tipo de microorganismo o por combinaciones de estos, con el fin de lograr mayor eficiencia al colonizar el intestino (Millán *et al.*, 2007; Sarker *et al.*, 2010).

Diversos estudios han demostrado la utilización de microorganismos acidolácticos en formulaciones probióticas como: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Pediococcus* (Fuller, 1989), así como también *Saccharomyces* y *Candida*. Estos probióticos fermentan carbohidratos produciendo ácido láctico, acético y propiónico, provocando una disminución del pH en el intestino de las aves, logrando inhibir y controlar el crecimiento de diversos enteropatógenos como: *Echerichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria* sp. y *Clostridium perfringens*, en pollos de engorde. Pero debido a las exigencias nutricionales de éstos probióticos, a la poca estabilidad de algunos de ellos, y producción limitada de compuestos bioactivos, sumado al incremento de nuevas enfermedades infecciosas y resistencias antimicrobianas; cada vez más se hace necesaria la



búsqueda de nuevos probióticos con mejores características a los ya existentes (Tan *et al.*, 2009).

Si bien los probióticos son una alternativa natural para la salud intestinal del ave, la adquisición de estos microorganismos no se encuentra únicamente mediante la ingesta de formulaciones probióticas, sino también se puede obtener a través de la crianza extensiva de aves criollas. El ingreso y posterior establecimiento de estos microorganismos, como parte de la microbiota bacteriana intestinal del ave recién nacida, es mediante la crianza silvestre, ya que esta le permite tener contacto directo con su entorno en donde prima la interacción con otras especies y tener contacto directo con el suelo, lo cual le facilita el ingreso de bacterias benéficas y no benéficas que le permitirán complementar y seleccionar la microbiota intestinal para obtener una adecuada protección intestinal (Kabir, 2009).

El conocimiento de que el uso de probióticos puede sustituir las terapias con antibióticos con métodos menos agresivos ha dado como resultado una nueva visión en la industria farmacéutica al contemplar una tecnología global, desde el aislamiento de probióticos de ecosistemas específicos tales como un hato o una región geográfica, seleccionar y caracterizar a las bacterias responsables de la acción probiótica, producirlas a escala industrial, procesarlas y reintroducirlas a la dieta del animal (Rosmini *et al.*, 2004).

## **2.8 Actinomicetos**

Los actinomicetos constituyen un grupo heterogéneo de bacterias gram positivas, estos microorganismos son principalmente aerobios, aunque algunos géneros son facultativos o anaerobios obligados. Históricamente se les llegó a considerar como hongos debido a que su morfología y desarrollo presentaban una gran similitud. Sin embargo, en la actualidad y dado a que poseen carácter procariótico, se ha demostrado que se clasifican como bacterias, por la presencia de peptidoglucano en su pared celular, por no poseer organelos presentes en eucariotas, ni un núcleo definido; sin embargo, su único ADN cromosómico en algunos *Streptomyces* suele ser abierto y no circular (Franco, 2008; Prescott *et al.*, 2004).

Los actinomicetos son bacterias con alto contenido de Guanina y Citocina (G + C 75 por ciento) en su ADN (Ezziyani *et al.*, 2004). Estos microorganismos presentan diversas

características morfológicas, lo cual hace compleja su taxonomía, así como su estudio y clasificación, actualmente se intenta resolver mediante técnicas de MSL (Análisis Multilocus de Secuencias) de secuencias parciales de secuencias housekeeping con diferente nivel de conformación que codifican proteínas; que combinado con el del gen 16S y 23SrRNA, ha permitido agruparlos sistemáticamente dentro del phylum Actinobacteria (Kämpfer, 2000).

Los actinomicetos se encuentran ampliamente distribuidos en ecosistemas naturales en todo el mundo y tienen gran importancia en la participación y degradación de la materia orgánica de origen animal y vegetal a través de enzimas extracelulares hidrolíticas y ligninolíticas (Ezziymani *et al.*, 2004, Salazar y Ordoñez., 2013), además de ciertas propiedades fisiológicas que los hacen particulares, es esta última característica la que lo convierte en un grupo microbiano con considerable atención de las industrias farmacéutica y alimentaria, en la biorremediación y últimamente en la agricultura (Ghanem *et al.*, 2000; Quiñones *et al.*, 2006). Los actinomicetos también habitan en diferentes sustratos, en los ecosistemas más diversos, desde materiales orgánicos en descomposición hasta plantas vivas, agua dulce, sedimentos marinos y organismos, entre otros (Quiñones *et al.*, 2016; González *et al.*, 2005).

Los hábitats que ocupan están en relación con sus características morfológicas (presencia o ausencia de micelio aéreo, coloración de colonia, formación de esporas / esporangio), sus características bioquímicas (constitución de pared), metabólicas (aerobios y anaerobios facultativos, mesofílicos y termofílicos), y fisiológicas (utilización de diferentes fuentes de carbono, de energía) (Salamoni, 2005).

El crecimiento de estas bacterias sobre un medio sólido como el agar, es en forma de una red ramificada conformada por hifas que desarrollan los actinomicetos, la cual crece tanto en la superficie como en su interior, denominándose micelio de sustrato, mientras que el micelio aéreo se extiende por encima del micelio de sustrato, siendo el micelio de menor diámetro que el de los hongos, otra de las características importantes que los acerca a las bacterias (Prescott, 2002).

A partir del micelio aéreo, se originan esporas asexuales llamadas conidios o conidiosporas. La forma de las esporas es muy variada (Figura 1) y se desarrollan por la formación de tabiques en la punta de los filamentos en respuesta al estrés (privación de nutrientes); además, son estructuras capaces de resistir el calor y la desecación y de permanecer latente por largos periodos, lo cual es de considerable valor para la supervivencia en la naturaleza (Prescott, 2002). Si bien es cierto las esporas de actinomicetos son capaces de resistir condiciones extremas en su entorno, existen tres factores que influyen en la distribución y en la actividad de muchos actinomicetos en la naturaleza: pH, la temperatura y el tipo de sustrato, principalmente su composición (Tate, 2000).

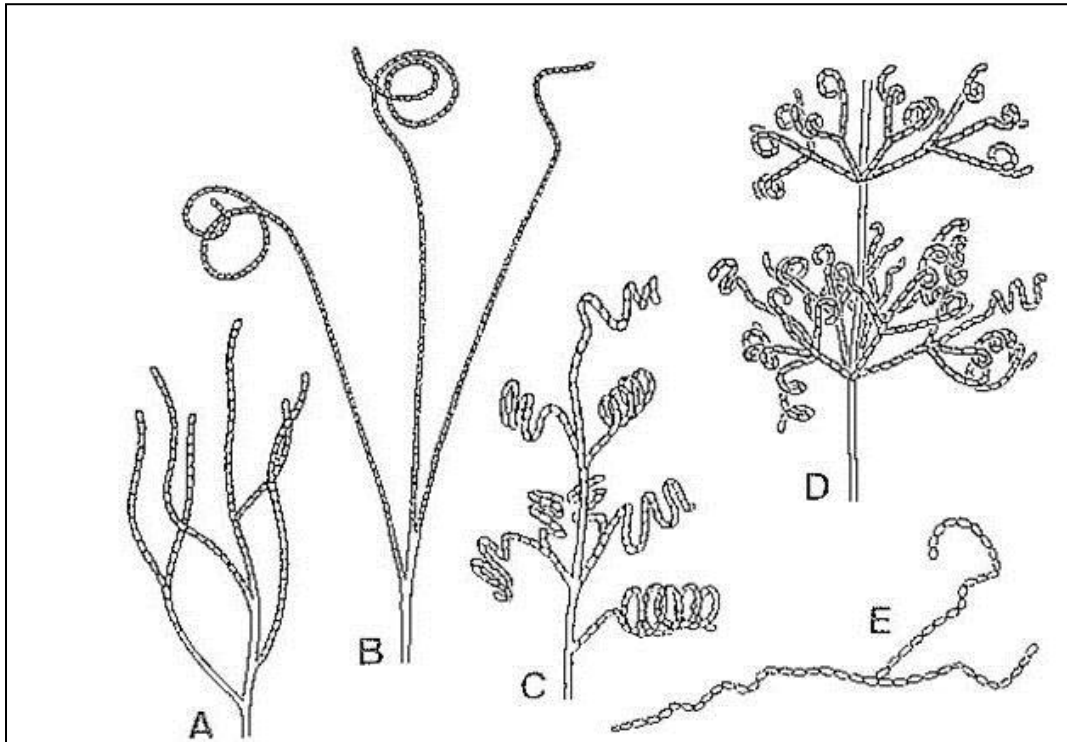
Los actinomicetos tienen una actividad metabólica alta, producen diversos compuestos como terpenoides, pigmentos y presentan un olor típico a tierra húmeda por la producción de un metabolito llamado geosmina. La mayoría son mesófilos y su crecimiento se registra entre 25 °C y 30 °C (Prescott, 2002), por ello no solo se encuentran en el suelo, sino también se conoce que están ampliamente distribuidos en ambientes acuáticos como océanos, ríos y lagos, donde también se encuentran asociados a los sedimentos, sobre todo en el material orgánico que está en proceso de descomposición y en simbiosis con otros seres vivos (Sialer, 2011; Quiñones *et al.*, 2016).

Los actinomicetos son llamados agentes biocontroladores, por su capacidad de producir enzimas biodegradativas como quitinasas, celulasas, gluconasas, peroxidasas y otras, involucradas en el papel de micoparasitismo que llevan a cabo estos microorganismos (Tokala *et al.*, 2002; Márquez *et al.*, 2003). Además, son productores de diversos compuestos bioactivos, tanto por sus estructuras químicas como por su actividad biológica, siendo los principales productores de antibióticos utilizados en la industria farmacéutica (Franco, 2009). En la actualidad, existen más de 23 000 metabolitos secundarios identificados a partir de microorganismos, en donde el 42 por ciento son producidos por actinobacterias, el 42 por ciento por hongos y el 16 por ciento por otras bacterias (Kekuda *et al.*, 2010).

Actualmente existen diversos estudios realizados en actinomicetos, entre ellos los *Streptomyces*, que debido a su importancia económica y médica en la producción de

antibióticos es que estos microorganismos han sido objeto de una variedad de estudios, siendo el caso de Latha *et al.*, (2016) quienes realizaron estudios en aves donde se comprobó la existencia actinomicetos aislados de las heces de pollos. El estudio se basó en el aislamiento 18 cepas de actinomicetos a partir de las heces, en dichas cepas se comprobó su capacidad para sobrevivir en pH ácido, expuestas a la bilis y a la pancreatina, con propiedades de adhesión, susceptibilidad a antibióticos y actividad no hemolítica. Tal estudio seleccionó una cepa, la cual presentó las mejores características de adaptación a los diversos enfrentamientos realizados in vitro, la cual se identificó como *Streptomyces* sp.. Finalmente, la bacteria *Streptomyces* sp. fue sometida a pruebas bajo protocolos estándares internacionales y gracias a sus propiedades morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y la caracterización molecular del ADN, se logró determinar la habilidad del *Streptomyces* para desarrollarse como un probiótico.

A su vez, existen investigaciones sobre la potencial aplicación de actinomicetos como probióticos en la acuicultura, demostrando ventajas en la producción controlada de organismos acuáticos en diversas etapas de su desarrollo larval y juvenil (Ronsón y Medina, 2010). León *et al.*, (2016) demostró que los sedimentos marinos de la costa central del Perú son fuente promisoría de numerosas cepas de actinomicetos con gran capacidad de producir compuestos bioactivos capaces de inhibir patógenos como multidrogo-resistentes tales como *S. aureus* metiliciclina resistentes y *E. faecalis* vancomicina resistentes. Los actinomicetos también son usados como agentes de control biológico de enfermedades radiculares, la presencia endofítica de *Streptomyces* sp., puede jugar importantes roles en el desarrollo de la salud de plantas, ya que ellos pueden afectar el crecimiento de estas por la asimilación de nutrientes o por la producción de metabolitos secundarios (Behal, 2000; Tokala *et al.*, 2002).



**Figura 1: Morfología de estructuras portadoras de esporas**

A rectiflexible, B rectos con ganchos, C espirales cerrados, D verticiladas, E flexibles

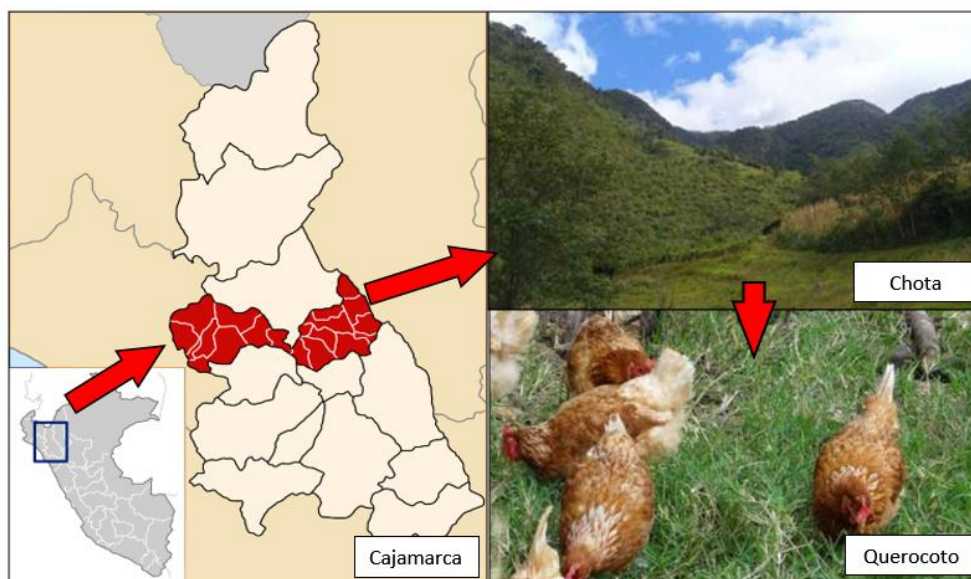
Fuente: Li *et al*, 2016

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Localización y fecha

La fase de campo del presente trabajo de investigación se realizó en la comunidad de El Obraje, ubicado en el distrito de Querocoto, provincia de Chota-Cajamarca; a una altura aproximada de 2,455 m.s.n.m. (INEI, 2000) (Figura 2). Geográficamente se encuentra a 6°33'46" latitud sur y 78°38'57" latitud oeste (SENAMHI, 2019).

Mientras que la fase de laboratorio se realizó en el Laboratorios de Microbiología del Departamento de Nutrición de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima Metropolitana, Perú. Geográficamente se encuentra a 12° 05' 06" Latitud sur y 76° 57' 00" longitud oeste a una altitud de 238 m.s.n.m. (SENAMHI, 2019) y del Centro de Investigación de Ilender, Jr. Bolognesi 156, Santa Clara Ate ubicado geográficamente a 12° 01' 42" latitud sur y 76° 53' 29" de longitud oeste. El presente trabajo de investigación se realizó en el mes de julio hasta diciembre 2018.



**Figura 2.** Mapa de ubicación de distrito de Querocoto, provincia de Chota. Cajamarca

Fuente: Recuperado de

[https://es.wikipedia.org/wiki/Provincia\\_de\\_Chota#/media/Archivo:Location\\_of\\_the\\_province\\_Chota\\_in\\_Cajamarca.svg](https://es.wikipedia.org/wiki/Provincia_de_Chota#/media/Archivo:Location_of_the_province_Chota_in_Cajamarca.svg)

## 3.2 Material biológico

### Animales

Se seleccionaron diez gallinas criollas, destinadas al consumo familiar de cuatro familias pertenecientes a la comunidad identificada para el estudio, en las que por lo menos una gallina perteneció a una familia. Dichas aves fueron examinadas clínicamente para evidenciar un estado de salud normal y considerarlas aptas para la toma de muestras biológicas. Las condiciones de crianza de las aves fueron propias de las zonas altoandinas en la cual predominaba un sistema extensivo de manejo, además estas aves eran de vida libre, con el espacio suficiente para desarrollar sus conductas naturales y alimentadas con granos obtenidos de la zona como la quinua, cañihua y kiwicha.

### Bacterias

La cepa control para los ensayos de caracterización morfológica y fisiológica de los actinomicetos, se obtuvo del Centro de Investigación de Ilender.

- *Streptomyces* sp. CS080

Las bacterias utilizadas para las pruebas de antagonismo fueron obtenidas del laboratorio Cerper y Microbiologics. Inc.

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883
- *Listeria monocytogenes* ATCC 19111
- *Salmonella* sp. y *E. coli*, los cuales fueron aislada de muestras clínicas de pollos de engorde.

### **3.3 Materiales y equipos de laboratorio**

#### **3.3.1 Medios de cultivo**

- Caldo de cultivo peptona
- Medio Mueller Hinton
- Medio para realizar prueba bioquímica

#### **3.3.2 Soluciones**

- Alcohol al 70%
- Solución de rojo fenol

#### **3.3.3 Materiales**

- Beakers de 125, 250 y 600 ml (Pirex)
- Bolsas de polietileno (Ziploc)
- Eppendorf de 1.5 ml
- Frascos de vidrio con tapa de 250, 500 y 1000 ml
- Matraces Erlenmeyer
- Micropipeta (Boeco)
- Placas Petri desechables 100 x 15”
- Pipetas graduadas de 5 y 10 ml
- Pinzas
- Probetas graduadas de 100 y 1000 ml
- Tubos de prueba (plásticos y de vidrio)

#### **3.3.4 Equipos de laboratorio**

- Autoclave (Marca: Yamato, Modelo: SK 101 C)
- Balanza analítica (Marca: Mettler Toledo, Modelo: MS204S )
- Cabina de bioseguridad (Marca: Telstar, Modelo: Bio II advance 4)
- Incubadora (Marca: Binder, Modelo: BD-56)
- Microondas (Marca: Panasonic, Modelo: NN-ST676SRPK)
- Microscopio binocular (Marca: Carl Zeiss, Modelo: Primo Star)
- Refrigeradora (Marca: Indurama, Modelo: RI-489)



## **3.4 Métodos**

### **3.4.1 Toma de muestras**

Se realizaron las necropsias respectivas para una evaluación clínica y registrar el estado de salud general de las aves a muestrear para luego ser sacrificadas mediante la técnica de dislocación cervical (AVMA, 2001). Inmediatamente después, se procedió con la disección de pico, buche, molleja y de la cavidad abdominal con el objetivo de separar el tracto entérico desde el píloro hasta la bifurcación de los sacos ciegos. Una vez retirados los intestinos, se dispusieron sobre una mesa de tal forma que puedan identificarse las diferentes secciones intestinales.

Se procedió a hacer un corte longitudinal en sentido de craneal a distal para la toma de muestra las porciones del tracto digestivo cómo: pico, buche, molleja, duodeno, yeyuno, íleon, ciego y cloaca. Se hicieron colecciones de aproximadamente 1gr del contenido intestinal de las porciones seleccionadas que fueron colocadas en tubos estériles cerrados, para luego ser procesados. Además, se colectaron heces de las 10 aves. (Anexo 2).

### **3.4.2 Aislamiento de actinomicetos**

Las muestras de contenido intestinal previamente tomadas se procesaron en condiciones de asepsia dentro del laboratorio de Microbiología de la facultad de Zootecnia de la UNALM. En la Figura 3 y Figura 4 se muestra el proceso de aislamiento de actinomicetos.

#### **Pre-enriquecimiento:**

Se utilizó 9 ml de caldo peptona al 0.1 por ciento p/v por gramo de muestra, el cual fue vertido en tubos de ensayo. Finalmente, el tubo con la muestra y el caldo se colocó en la incubadora por cuatro horas a 30 ° C (Franco, 2008). Dichos procedimientos se realizaron para cada una de las 10 aves muestreadas. (Anexo 5)

### **Diluciones sucesivas:**

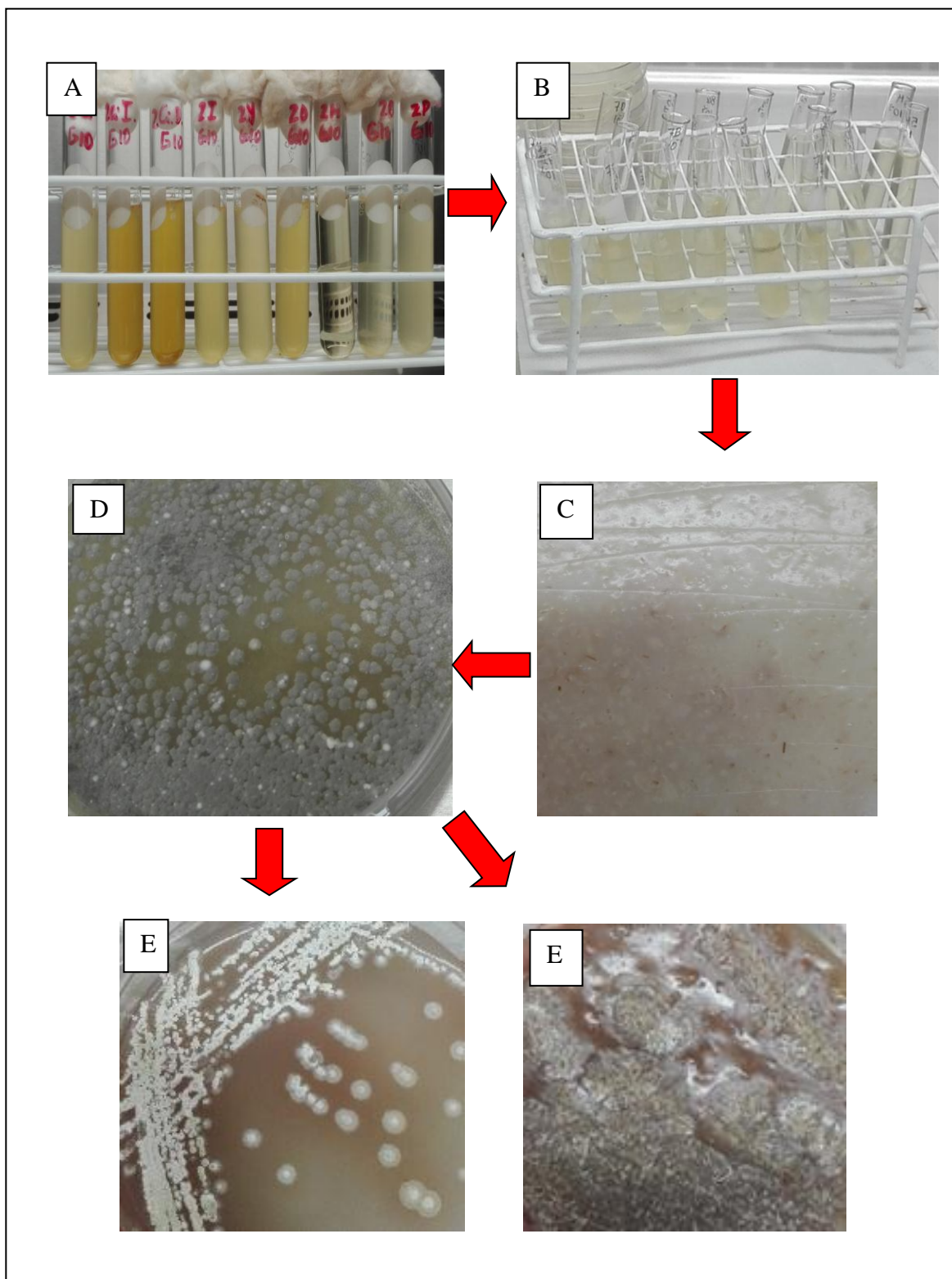
Luego de transcurrido el periodo de incubación de la fase de pre enriquecimiento, con ayuda de una micropipeta, se extrajo de los tubos que contenían las muestras, una alícuota de 1 g. de la mezcla homogenizada y se vertió en un tubo de ensayo con 9 ml de caldo peptona 0.1 por ciento p/v iniciando así las diluciones sucesivas (dilución cero). Se procede a homogenizar la nueva mezcla con ayuda de la micropipeta y se repite el mismo procedimiento, realizando diluciones seriadas, desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ . Finalmente se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas (Franco, 2008; Moreno *et al.*, 2015).

### **Siembra sobre medios de cultivo sólidos:**

Luego de obtener las diluciones sucesivas, se seleccionaron los tubos con las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , de los cuales se extrajo con ayuda de una micropipeta, 100  $\mu\text{l}$  de la mezcla, previamente homogenizada, y se inoculó sobre agar avena (preparada y dispensada sobre placas Petri estériles) (Anexo 1). Con ayuda de un asa bacteriológica se procedió a realizar las estrías sobre el agar avena y agar Mueller Hinton a partir del inóculo (Anexo 1). Luego de haber realizado las estrías sobre el agar, se espera a que el área estriada se encuentra completamente seca para invertir las placas y pasar a incubación a  $30^{\circ}\text{C}$  por el transcurso de 7 - 10 días para el crecimiento y esporulación de los actinomicetos (Franco, 2008 Moreno *et al.*, 2015).

### **Selección de colonias de actinomicetos:**

Transcurrido el tiempo de incubación, se seleccionaron las colonias de actinomicetos, las cuales se caracterizan por ser colonias convexas, en su mayoría blanquecinas, adheridas fuertemente a la superficie del agar, es decir bacterias formadoras de micelio tanto aéreo como de sustrato. Posteriormente las colonias fueron transferidas a placas Petri con agar avena, obteniéndose así los cultivos puros y la asignación de códigos para cada una de ellas (Franco, 2008).



**Figura 3. Proceso de aislamiento de colonias de actinomicetos**

A. pre-enriquecimiento B. diluciones sucesivas C. siembra sobre agar avena D. aislamiento primario E. colonias puras.

Fuente: elaboración propia

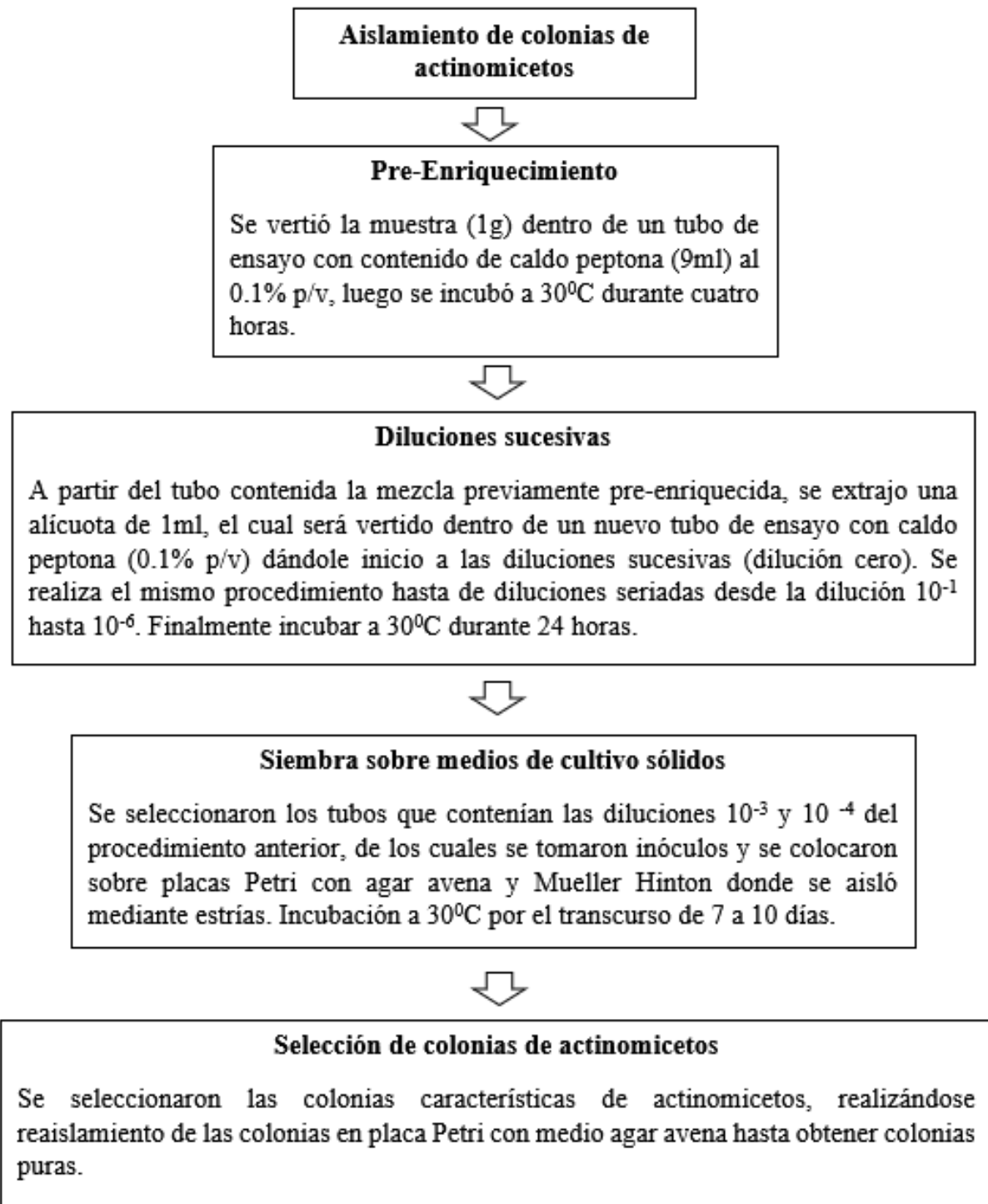


Figura 4. Procedimiento del aislamiento de colonias de actinomicetos

Fuente: Elaboración propia

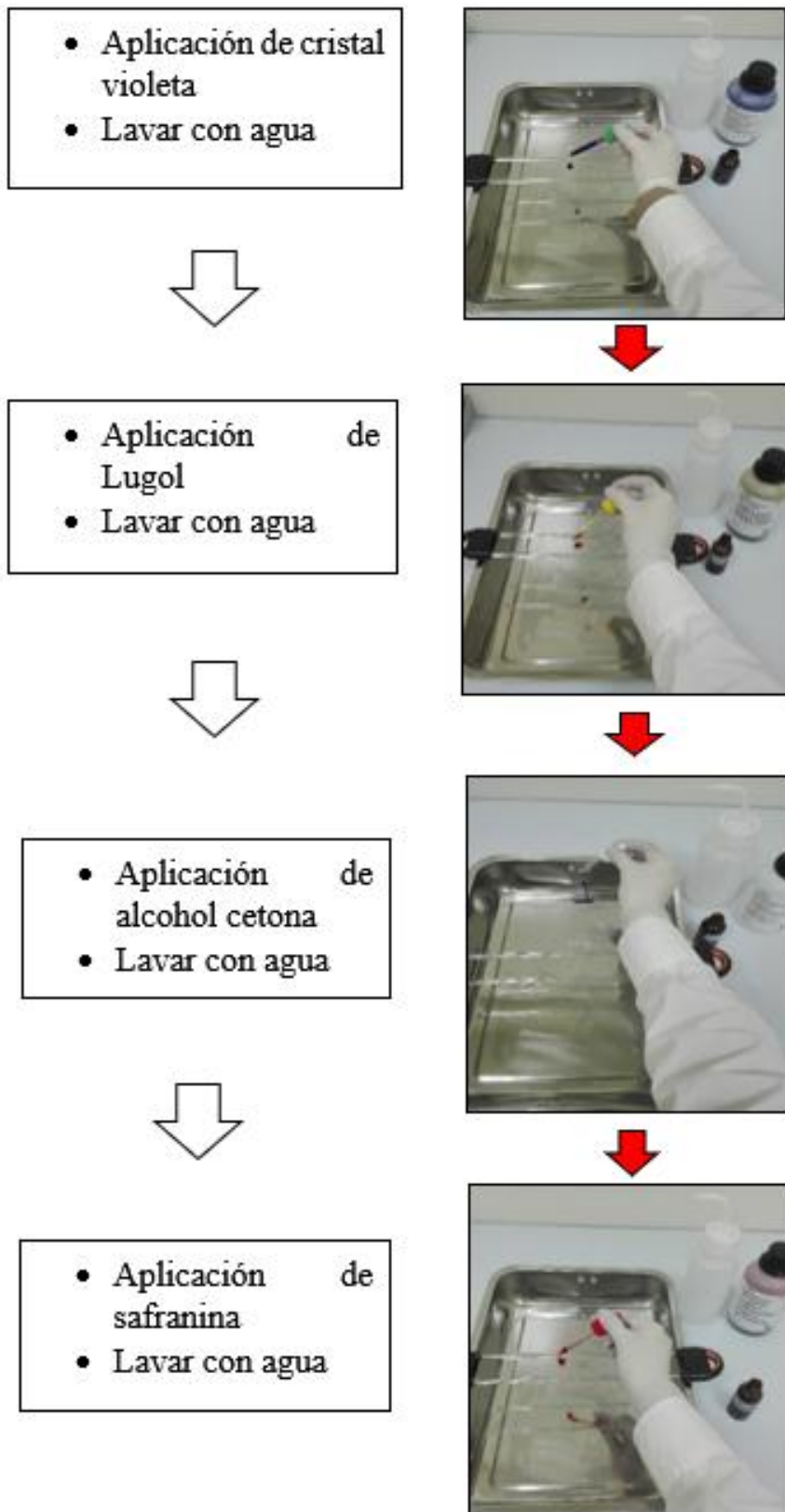
### **3.4.3 Identificación de los actinomicetos**

#### **a. Caracterización macroscópica**

La siembra de bacterias sobre los medios de cultivo se realizó por triplicado y se incubaron a 30°C durante 7 a 10 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluaron las características de crecimiento a nivel macroscópico, como características fenotípicas: textura, color de micelio de sustrato, color de micelio aéreo, y producción de pigmentos difusibles en el medio (Bergey, 2000). Los resultados en cuanto a colores fueron comparados con los establecidos en el Manual de Determinación Bacteriológico de Bergey (Bergey, 2000), además de las posibles variaciones existentes en colores según Franco, (2008) y León *et al.*, (2011) los cuales se encuentran registrados en el Anexo 3 y Anexo 4. Las características fenotípicas fueron comparadas con la cepa control

#### **b. Caracterización microscópica**

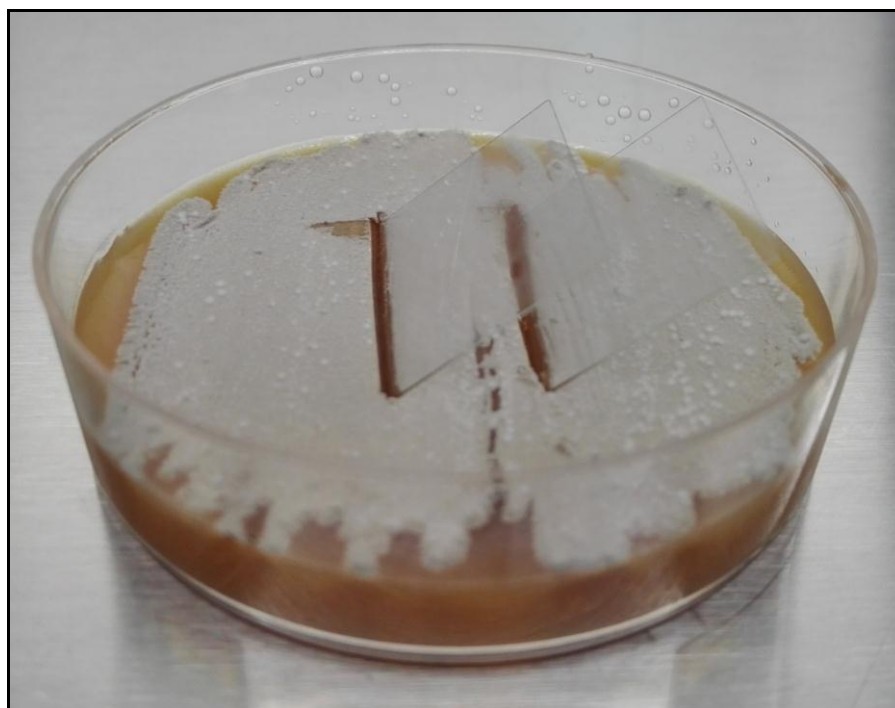
De las cepas de actinomicetos aisladas se extrajo una colonia aislada con un asa Kolle y se fijó en un portaobjeto previamente preparado con una gota de agua destilada; luego se realizó la tinción Gram. Para la identificación se utilizó un microscopio óptico con aumento de 100X, con lo cual se determinó que las cepas previamente caracterizadas pertenecían al grupo de las bacterias Gram positivas ya que pueden retener el colorante luego de la decoloración mostrando una coloración final violeta (Figura 5)(Rodríguez, 2010). Los resultados en cuanto a morfología fueron comparados con los establecidos en el Manual de Determinación Bacteriológico de Bergey (Bergey, 2000),



**Figura 5. Proceso de técnica de tinción Gram**

Fuente: Elaboración propia

A su vez las cepas de actinomicetos aisladas fueron sembradas sobre agar avena, sobre las que se colocaron láminas cubre objeto con una inclinación de 45° respecto a la superficie del agar. Las placas se incubaron a 30°C durante 15 días, al cabo de los cuales se tomaron las laminillas y se colocaron sobre láminas porta-objetos para la observación al microscopio del micelio aéreo (40X y 100X), micelio de sustrato y la formación de propágulos (Figura 6) (Bergey *et al.*, 2000).



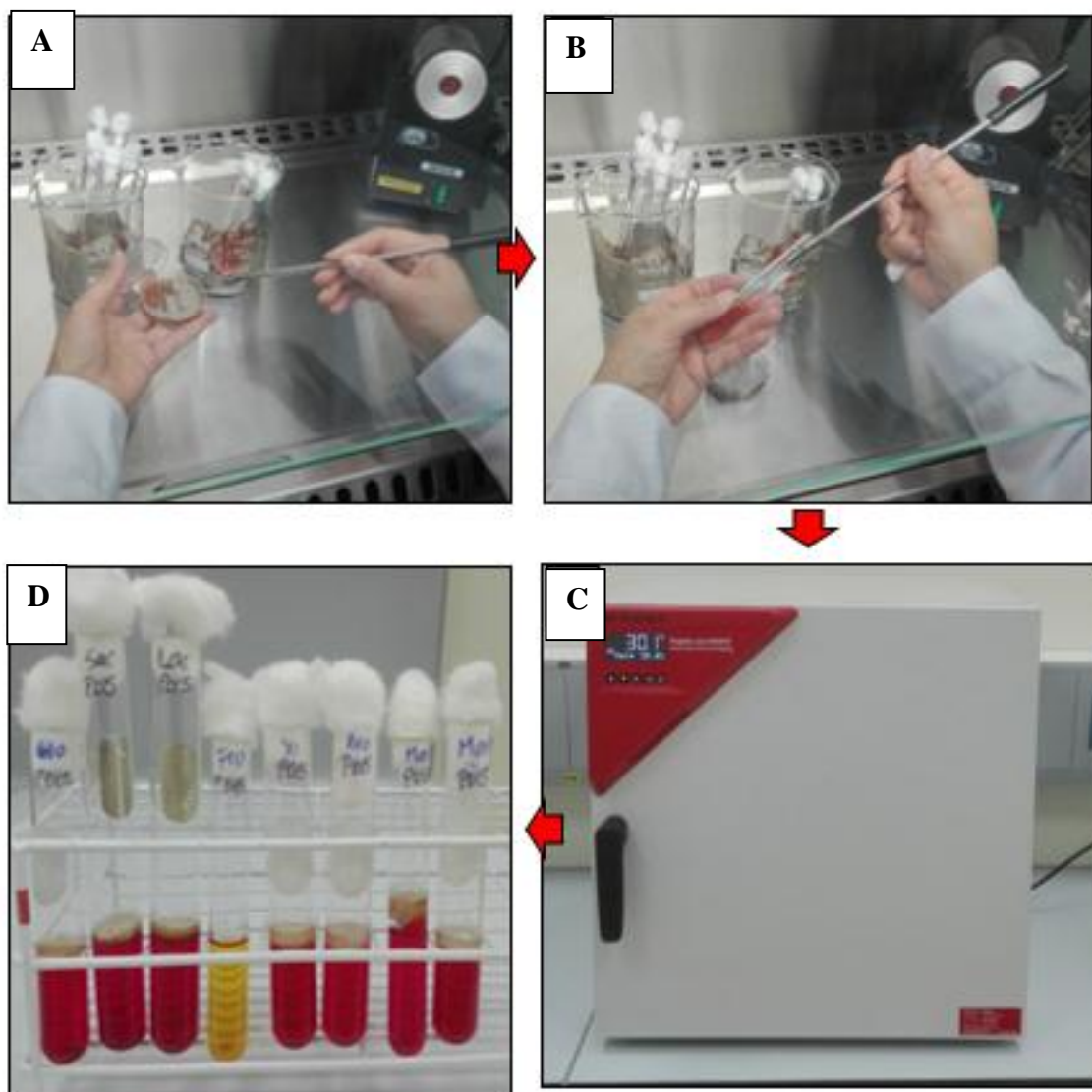
**Figura 6. Método para la observación al microscopio de los micelios y formación de propágulos de los actinomicetos**

Fuente: Elaboración propia

### **c. Caracterización bioquímica**

La caracterización bioquímica de los actinomicetos aislados permitirá identificar y evaluar su perfil metabólico, mediante la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas, a través de la utilización de ciertos sustratos como fuentes de carbono y nitrógeno. Se inocularon cada una de las cepas aisladas en tubos conteniendo caldo nutritivo y el indicador rojo fenol con diferentes carbohidratos como: glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa, manitol, xilosa, manosa, lactosa y arabinosa (Ventura *et al.*, 2007; Kämpfer, 2012).

Cada prueba bioquímica se incubó a 30 °C por 48 horas, pasado el tiempo de incubación se observaron los resultados de acuerdo con cada reacción (Benavides y Hermida, 2008) (Figura 7). Los resultados fueron medidos en base al crecimiento y viraje de color como indicador de uso del sustrato como fuente de carbono (Abdulla y El-Shatoury, 2006), además los resultados fueron comparados con los establecidos en el Manual de Determinación Bacteriológico de Bergey (Bergey, 2000), así como también comparados con los resultados de la cepa control.



**Figura 7. Proceso de realización de pruebas bioquímicas**

A. Extracción de esporas de actinomicetos de cultivos en agar avena B. inoculación C. Incubación D. Lectura de resultados

Fuente: Elaboración propia



#### **3.4.4 Determinación del efecto de granos andinos sobre la producción de esporas de actinomicetos**

Para determinar el efecto de los granos andinos sobre el desarrollo y producción de esporas de los actinomicetos aislados de gallinas criollas, se procedió a preparar diferentes medios de cultivos sólidos, utilizando como sustrato principal granos andinos como: quinua, kiwicha, cañihua y maíz. Para la preparación de los medios de cultivo se procedió a moler los granos andinos por separado hasta obtener partículas finas con apariencia de harina, para luego proceder a la preparación del medio de cultivo como se indica en el Anexo 6. Finalmente se procedió a servir el medio en placas Petri, se realizó la siembra de esporas mediante la técnica de estrías y se incubó a 30 °C durante 10 días.

#### **3.4.5 Determinación de la actividad antagónica**

La capacidad de los actinomicetos para inhibir el crecimiento de determinados microorganismos patógenos fue valorada mediante el método denominado “cilindros en agar” (Schwalbe *et al.*, 2007). Como cepas indicadoras biológicas se emplearon: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Listeria monocitogenes* (ATCC 13883), así como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de pollos de engorde. Sobre la cepa control CS080 se probaron las cepas de *Listeria monocitogenes* (ATCC 13883) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Las cepas utilizadas como indicadores biológicos fueron inoculadas en matraces con 350 ml de medio agar Mueller Hinton (en estado líquido), posteriormente fueron servidos sobre placas Petri. Una vez frío y endurecido, sobre el agar se colocaron porciones extraídas de agar avena (trozos de agar en forma cilíndrica de 9 mm de diámetro, extraídos con un sacabocado) donde previamente los actinomicetos crecieron y esporularon, luego se colocaron en el refrigerador durante cuatro horas para permitir la difusión de los compuestos bioactivos y luego incubadas a 33.5 °C en condiciones de aerobiosis. Se evaluó, luego de 24 horas de incubación, la presencia o ausencia de un halo de inhibición, realizándose la medición de los halos de inhibición con una regla graduada (Goodfellow y Cross *et al.*, 1984). Se comparó con los resultados de la cepa control.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

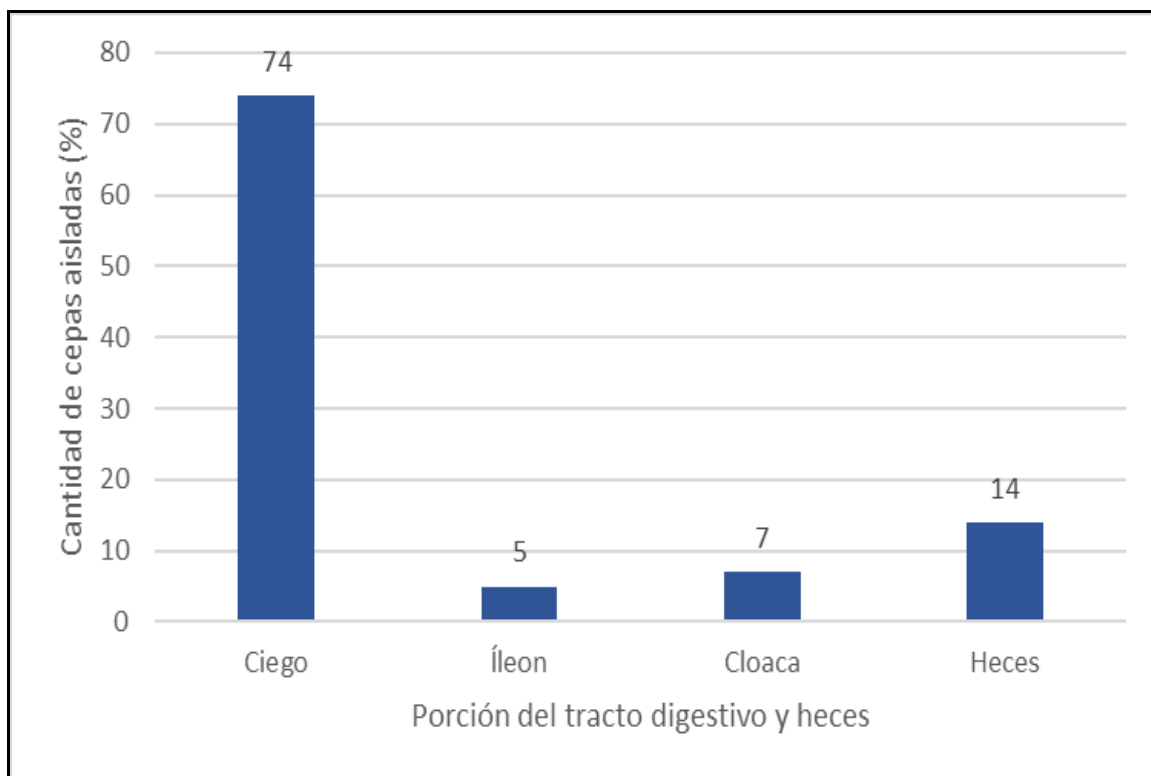
### 4.1 Toma de muestras y aislamiento de actinomicetos

La edad de las aves se determinó mediante la evaluación clínica, en donde el ave 1, 4, 6, 8, 9 y 10 se encontraron un rango mayor a las 24 semanas, pero menor a las 80 semanas, las aves 2 y 7 con un rango mayor a las 80 semanas y las aves 3 y 5 presentaron un rango menor a las 24 semanas. En base a la edad se determinó la etapa de manejo en la que se encontraban dichas aves, siendo las aves 1, 4, 6, 8, 9 y 10 las que se encontraban en etapa de postura, las aves 2 y 7 en etapa de descarte y las aves 3 y 5 en etapa de levante).

Los principales hallazgos encontrados durante la necropsia se reportaron en los Anexo 2, siendo uno de ellos la presencia de parásitos en las porciones distales del intestino los cuales no fueron hallados en el ave 2, se asume se deba al tipo de crianza (extensiva).

En la Figura 8, se puede observar que la cantidad de las cepas aisladas de actinomicetos provenientes del tracto digestivo de gallinas criollas fueron 42, de las cuales la mayor cantidad de actinomicetos aislados se obtuvieron del ciego, llegando a un total de 31 cepas representando un 74 por ciento del total, al respecto Abad *et al.*, (2008) coinciden con los resultados anteriormente reportados. De igual manera se logró aislar actinomicetos de otras regiones del tracto digestivo, del íleon en un 5 por ciento y de la cloaca en un 7 por ciento. Dichos resultados pueden deberse a que la presencia de actinomicetos en las diferentes porciones del tracto digestivo y en las heces es a causa de características químicas y físicas como el pH y la temperatura que presentan las diferentes regiones del tracto gastro intestinal del ave. Esto explica, que en estas porciones del tracto digestivo el pH se encuentra en un rango de 6,9 a 8, siendo este un pH muy cercano al rango óptimo de 6.5 a 8 requerido por los actinomicetos; mientras que en el factor temperatura los actinomicetos poseen un rango óptimo para su crecimiento entre los 25 °C y 30 °C, los cuales a temperaturas inferiores a 5 °C el crecimiento es casi nulo y temperaturas superiores a 55 °C solo algunas especies presentan

crecimiento. Por ello, el tracto gastro intestinal de las gallinas al poseer una temperatura interna de 40 °C, permite el crecimiento de actinomicetos. (Quiñones *et al.*, 2016; Franco, 2008; Jerez *et al.*, 2015).








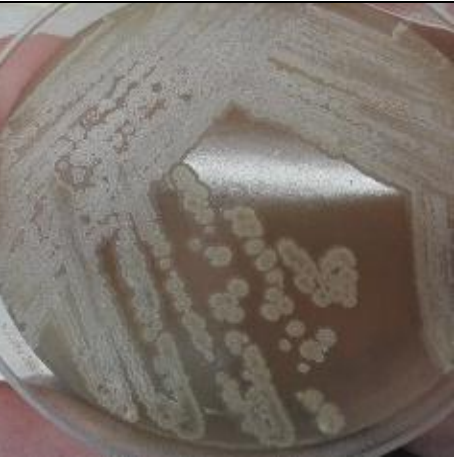
**Figura 8. Porcentaje de cepas aisladas del tracto gastrointestinal de gallinas criollas y heces**

Fuente: Elaboración propia


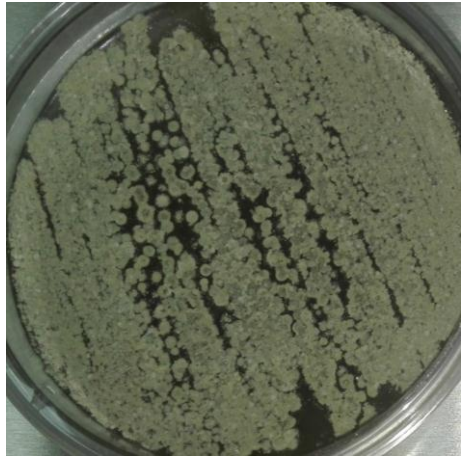
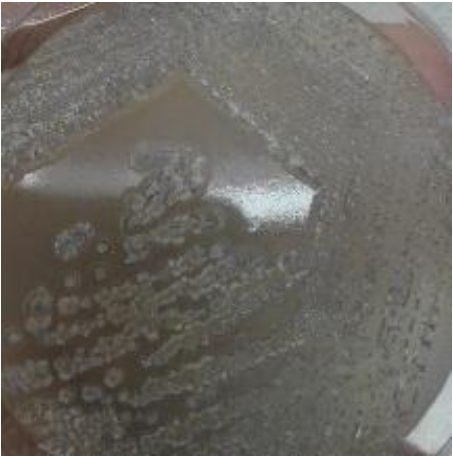
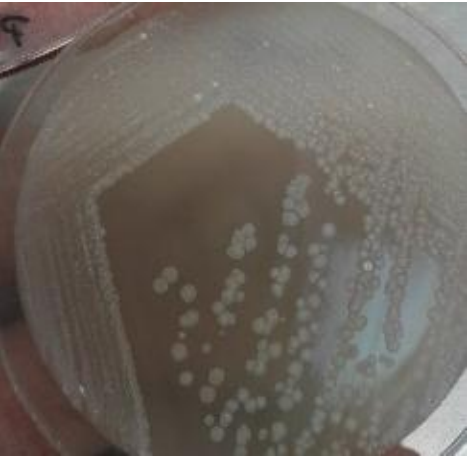
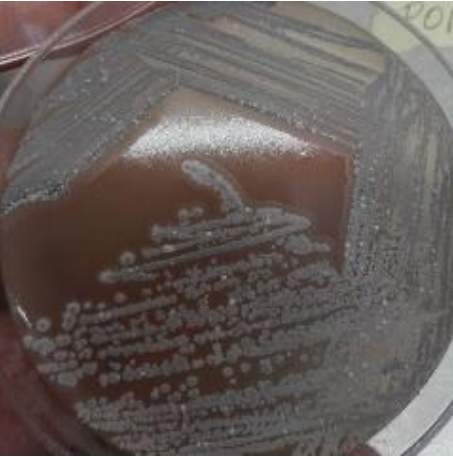
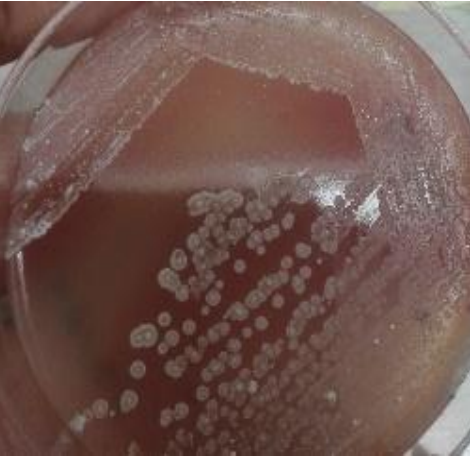
Al mismo tiempo en la presente investigación se lograron aislar 6 cepas de actinomicetos provenientes de las heces, el cual se encuentra representando un 14 por ciento del total de cepas aisladas. Al respecto, Piñero y Rivas., (2004), reportaron aislamientos de cepas de actinomicetos a partir de estiércol de pollo, de igual manera, Escobar *et al.* (2012), reportaron la presencia de actinomicetos del género *Streptomyces* y *Nocardia* en cantidades leves a moderadas respectivamente, en gallinaza de aves de corral. A su vez Latha *et al.*, (2016), lograron obtener en su investigación aislamientos de actinobacterias a partir de heces de pollos. Es por ello que la presencia de actinomicetos en las heces se puede deber a que las heces se originaron en la porción terminal del tracto digestivo en donde el pH y la temperatura se encuentran dentro de los niveles óptimos y aceptables para el desarrollo de los actinomicetos.

## 4.2 Identificación de actinomicetos


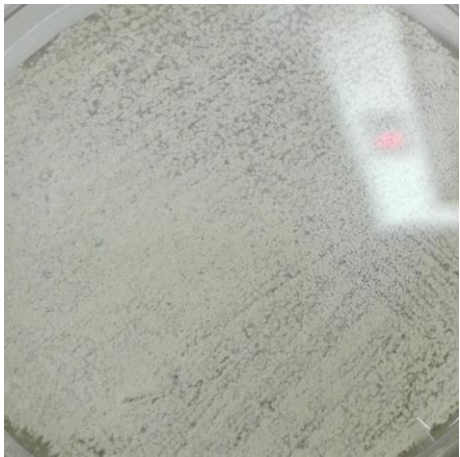

### 4.2.1 Caracterización macroscópica

CEPA	CARACTERISTICAS MACROSCÓPICAS	CEPA	CARACTERISTICAS MACROSCÓPICAS
P001		P002	
P003		P004	
P005		P006	

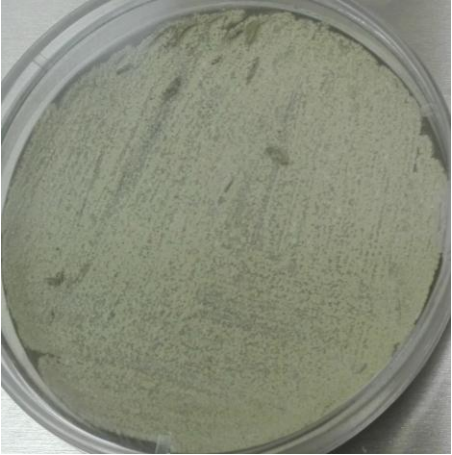
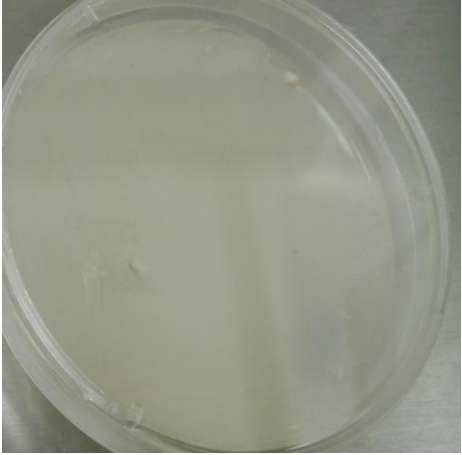
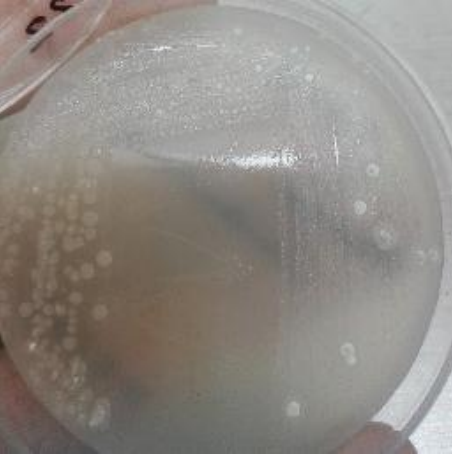



Continuación...

<p><b>P007</b></p>		<p><b>P008</b></p>	
<p><b>P009</b></p>		<p><b>P010</b></p>	
<p><b>P011</b></p>		<p><b>P012</b></p>	




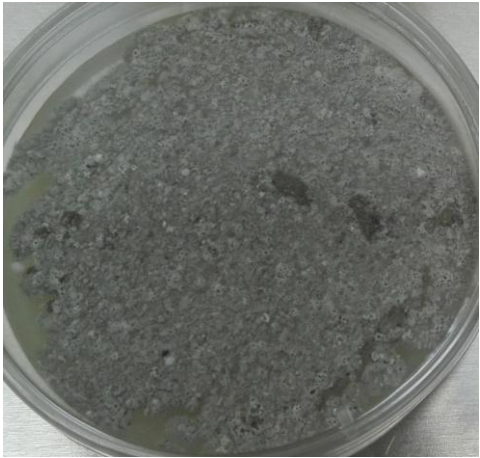
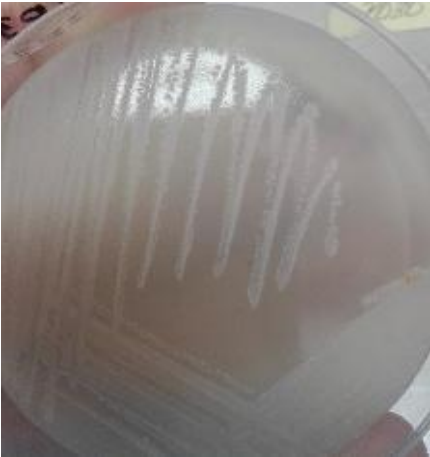
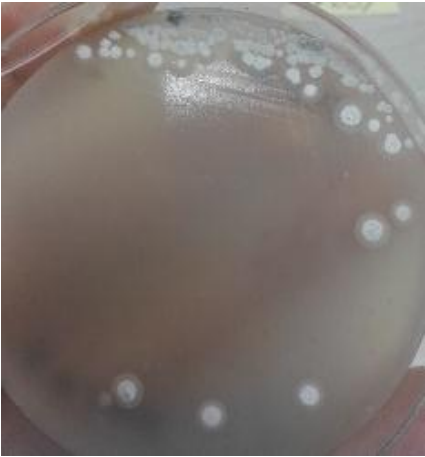
Continuación...

<p><b>P013</b></p>		<p><b>P014</b></p>	
<p><b>P015</b></p>		<p><b>P016</b></p>	
<p><b>P017</b></p>		<p><b>P018</b></p>	

Continuación...



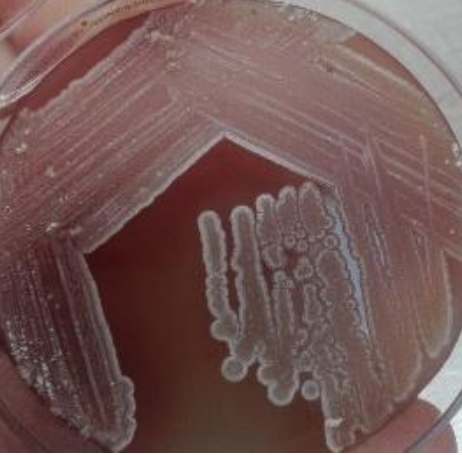

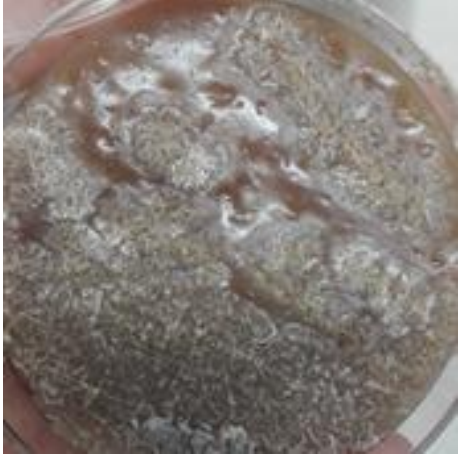

<p>P019</p>		<p>P020</p>	
<p>P021</p>		<p>P022</p>	
<p>P023</p>		<p>P024</p>	

Continuación...






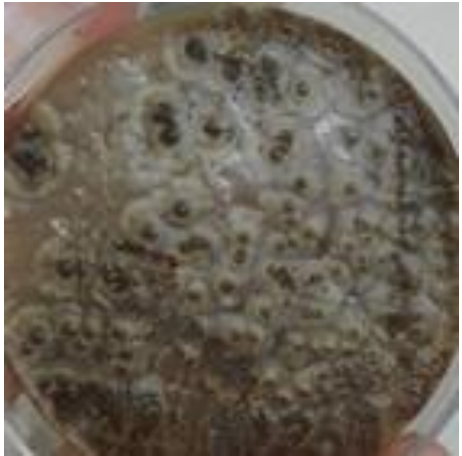
<p><b>P025</b></p>		<p><b>P026</b></p>	
<p><b>P027</b></p>		<p><b>P028</b></p>	
<p><b>P029</b></p>		<p><b>P030</b></p>	



Continuación...

<p><b>P031</b></p>		<p><b>P032</b></p>	
<p><b>P033</b></p>		<p><b>P034</b></p>	
<p><b>P035</b></p>		<p><b>P036</b></p>	

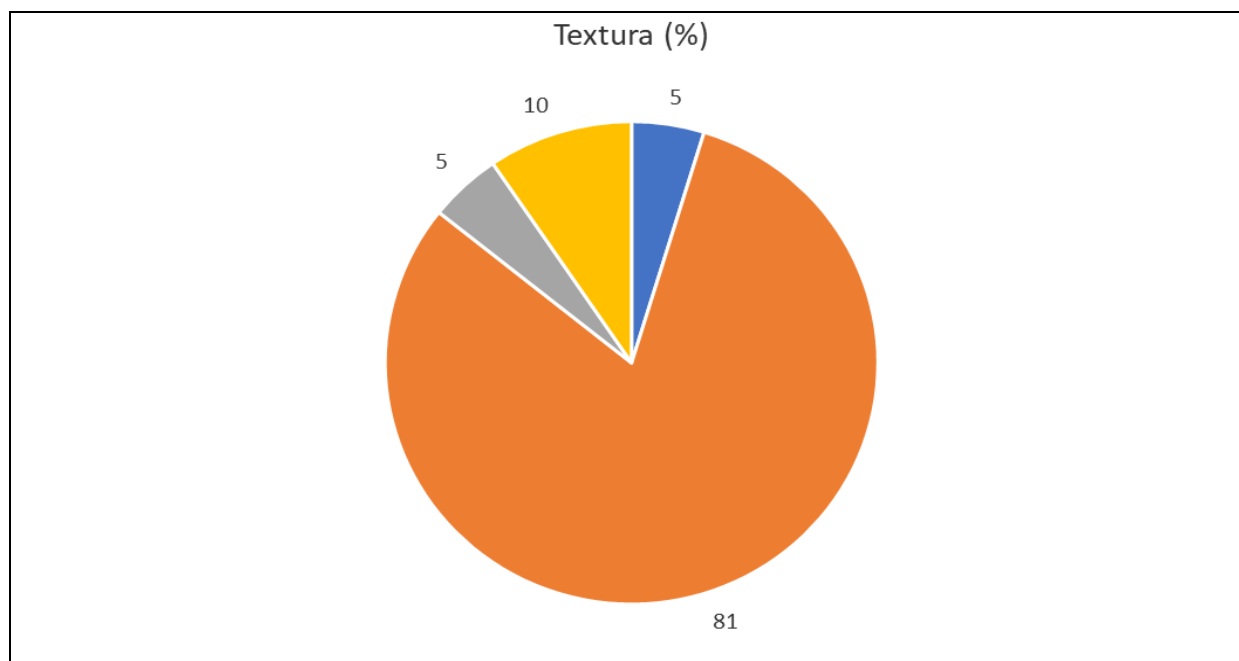
Continuación...

<p><b>P037</b></p>		<p><b>P038</b></p>	
<p><b>P039</b></p>		<p><b>P040</b></p>	
<p><b>P041</b></p>		<p><b>P042</b></p>	

**Figura 9. Características macroscópicas de cepas de actinomicetos**

Fuente: Elaboración propia

Las colonias de actinomicetos fueron caracterizadas según su textura, color de micelio de sustrato, color de micelio aéreo, presencia y color de pigmento difusible en el medio (Bergey, 2000) (Anexo 7).

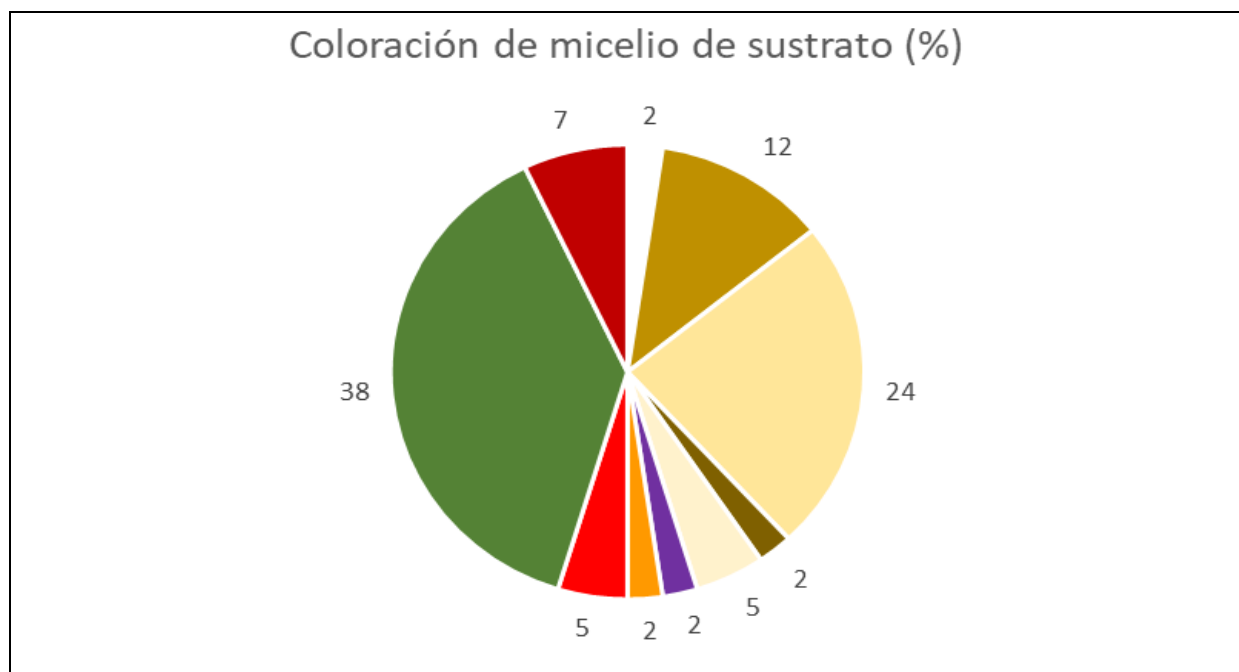


**Figura 10. Porcentaje de las cepas de actinomicetos basado en la textura**

Fuente: Elaboración propia

Durante el ensayo se lograron caracterizar un total 42 cepas de actinomicetos reportados en la Figura 10, de las cuales el 81 por ciento presentaron textura pulverulenta, lo cual pueda deberse a consecuencia de la formación de largas cadenas de esporas originadas por la subdivisión de la hifa aérea (Sylvia 2005). Al respecto Madigan *et al.*, (2009) afirma que la mayor parte de actinomicetos presentan apariencia pulverulenta en las colonias maduras, lo cual corrobora que la mayor cantidad de actinomicetos aislados presentaron textura pulverulenta debido a que este tipo de textura es la más común entre ellos. Así mismo se obtuvo que el resto de las cepas presentaron textura tizosa, representada por el 10 por ciento, textura seca con el 5 por ciento y textura aterciopelada con el 5 por ciento. Estos resultados concuerdan con lo reportado por León *et al.*, (2007) quienes lograron aislar actinomicetos con apariencia tizosa. De acuerdo con lo anteriormente reportado y en base a los resultados obtenidos en la presente investigación, la textura de tipo tizosa también pueda deberse a que las colonias, que inicialmente poseían una apariencia ligeramente húmeda y brillante, pero con que con el transcurrir del tiempo se volvieron opacas y secas, adquiriendo una apariencia

tizosa o yesosa. Todo esto se hace referencia en los estados de conversión por los que pasan las hifas aéreas hasta llegar a la formación de esporas (León, 2016).

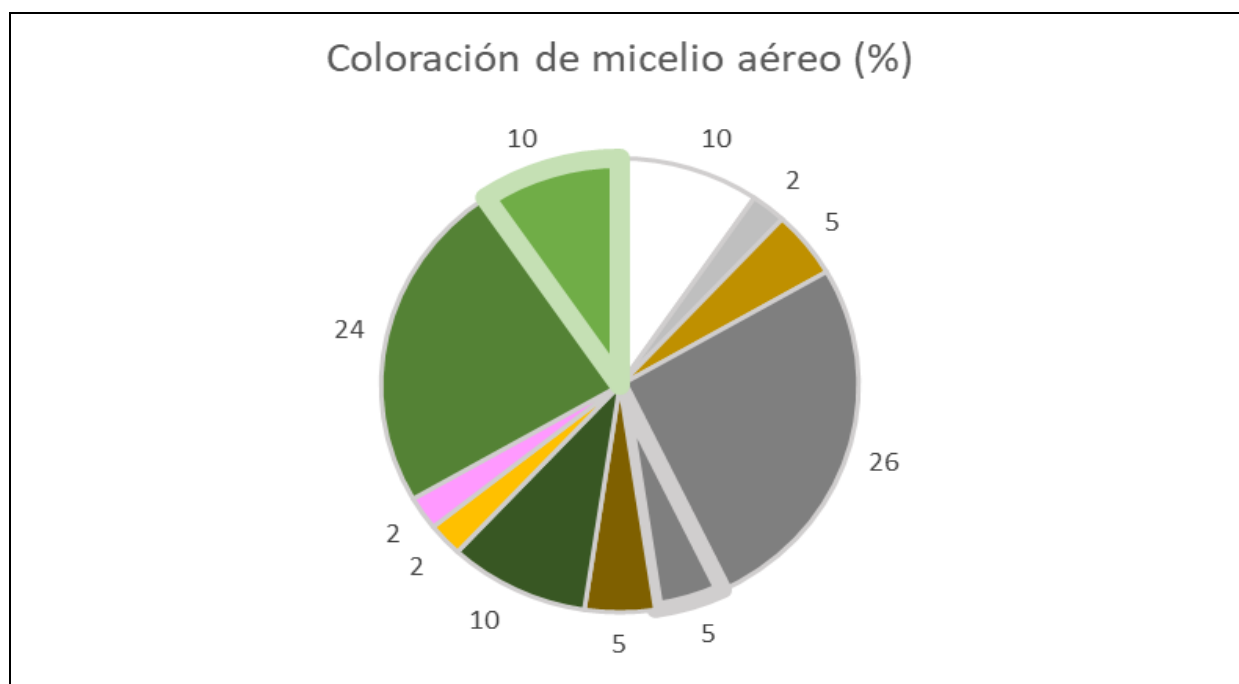


**Figura 11. Porcentaje de las cepas de actinomicetos basado en la coloración de micelio de sustrato**

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 11, la coloración del micelio de sustrato, nos permitió visualizar que el 38 por ciento de las cepas presentó color verde, 24 por ciento color café claro, 12 por ciento color café, 7 por ciento color marrón rojizo, 5 por ciento color crema, 5 por ciento color rojo, 2 por ciento color blanco, 2 por ciento café oscuro, 2 por ciento color morado, 2 por ciento naranja oscuro. La cepa control CS080 presentó color de micelio de sustrato gris. Resultados similares fueron obtenidos por León *et al.*, (2011) al evaluar las características macroscópicas en actinomicetos, pudo obtener que el 8 por ciento de los actinomicetos presentó color marrón rojizo. De igual forma Rodríguez, (2011) coincide con las diferentes variedades de coloración de colonias, las cuales pueden ser blanco, gris, crema y colores tierra. Por el contrario, otros investigadores reportaron la existencia de cepas con coloración de micelio de sustrato amarillo Dávila *et al.*, (2013), lo cual no fue obtenido en la presente investigación. A partir de ello se puede afirmar la coloración del micelio de sustrato puede depender del medio de cultivo utilizado, la temperatura, el pH y en algunos casos de la iluminación (Bergey, 2000). Además, la extensa variedad de colores obtenidos en la presente investigación puede deberse

a la amplia variedad existente de actinomicetos y su capacidad de poder diferenciarse entre ellos Franco, (2008). Estas particularidades observadas a nivel macroscópico hacen que el 100 por ciento de las cepas aisladas de actinomicetos pueda ser ubicado en el grupo de actinomicetos.

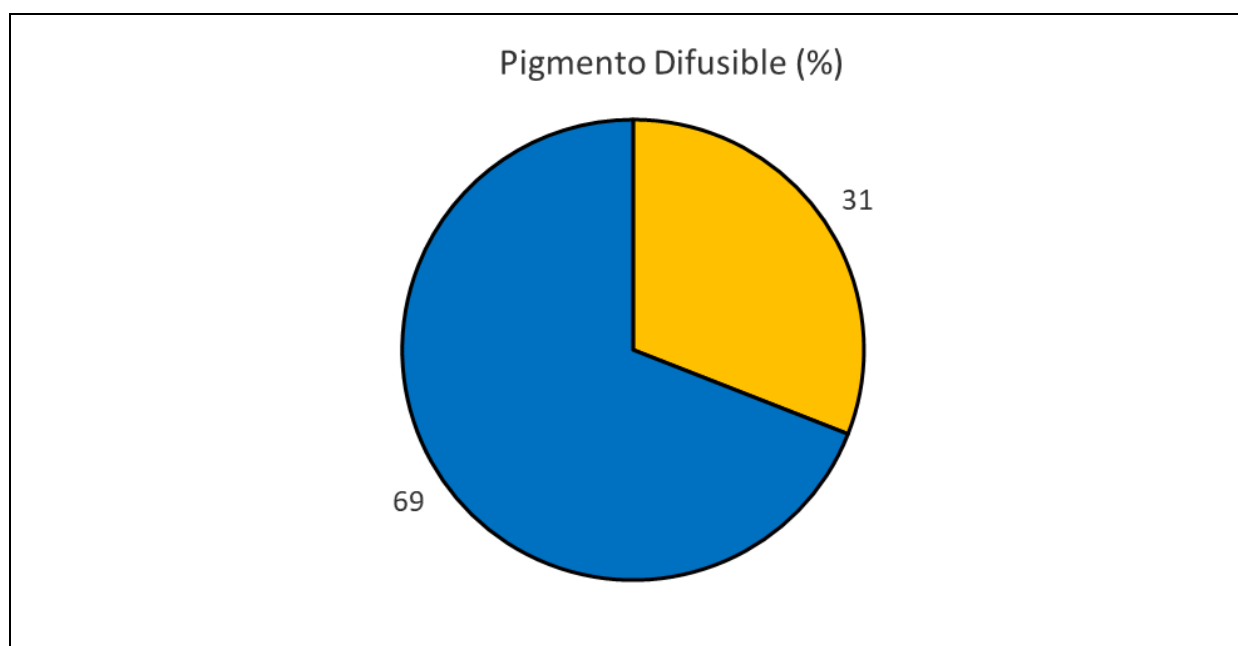


**Figura 12. Porcentaje de las cepas de actinomicetos basado en la coloración de micelio aéreo**

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 12, se puede apreciar la coloración del micelio aéreo, en donde se logró distinguir que el 26 por ciento presentó color gris, 24 por ciento color verde, 10 por ciento blanco, 10 por ciento marrón verde, 5 por ciento color café, con 5 por ciento color gris con bordes blancos, 5 por ciento color marrón, 2 por ciento color blanco grisáceo, 2 por ciento color naranja claro y 2 por ciento rosado tenue. La cepa control CS080 presentó color de micelio aéreo gris. Las variedades de colores presentados se puede afirmar según los resultados obtenidos en la investigación realizada por Franco (2008), quien demuestra que en cuanto al color existen semejanzas con lo reportado en la presente investigación, mientras que en las cantidades porcentuales presenta gran variación con respecto a la coloración gris con un 9 por ciento y gris con 27 por ciento, lo cual puede deberse al proceso de maduración de los actinomicetos, debido a que inicialmente presentan color de micelio de sustrato gris pero con el pasar del tiempo se tornan de un color blanco. Parte de estos resultados concuerdan con lo descrito por Piñero y Rivas., (2004), quienes lograron aislar actinomicetos que presentaban un

micelio aéreo de coloración marrón. Asimismo, Pérez *et al.*, (2015), en estudios previos reafirma que la coloración del micelio aéreo puede ser gris, blanquecino, blanco-grisáceo y verdusco con bordes blanquecinos. Esta diversidad de colores puede atribuirse a que la coloración del micelio aéreo está fuertemente influenciada por la composición del medio y a causa de la difusión dentro de las hifas aéreas dentro del pigmento producido por el micelio de sustrato el cual permite la modificación de su coloración verdadera (Wendisch & Kutzner 1986).

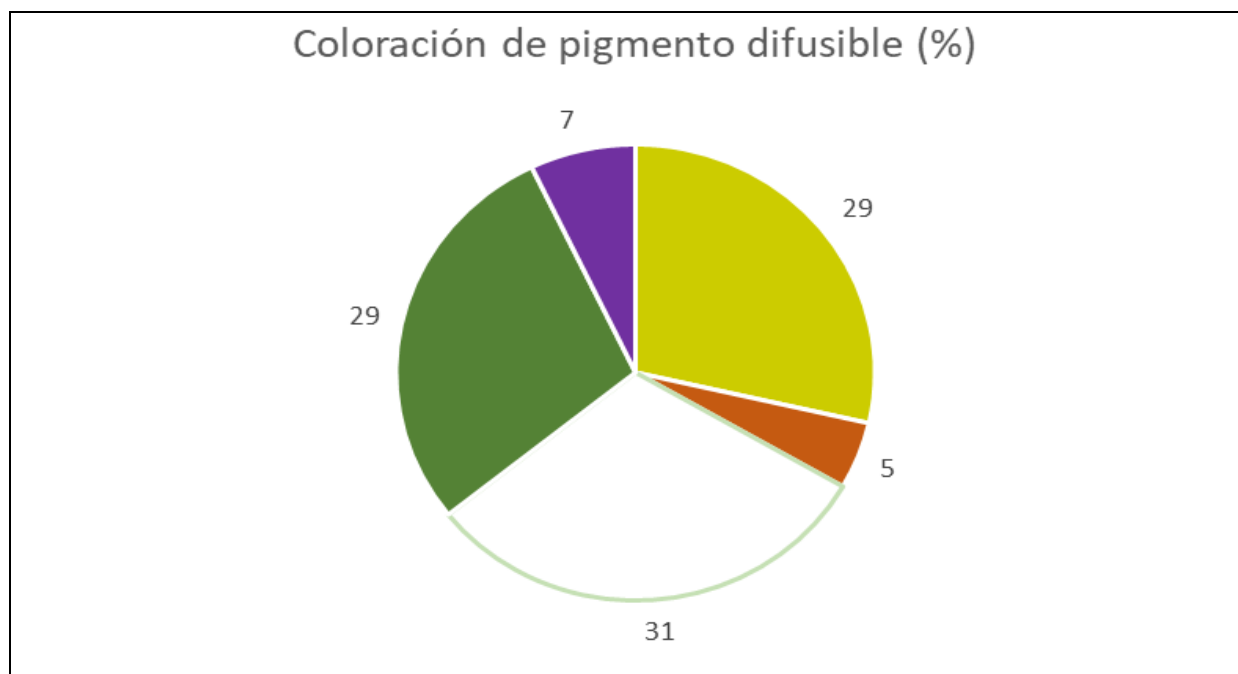


**Figura 13. Porcentaje de las cepas de actinomicetos basado en la producción de pigmento difusible**

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 13 se puede apreciar la caracterización según la presencia de pigmento difusible, el 31 por ciento, no presentó producción de pigmento difusible bajo nuestras condiciones de cultivo, mientras que el 69 por ciento restante si presentó diversos pigmentos. La cepa control CS080 presentó producción de pigmento difusible. Al respecto podemos suponer que la capacidad de producir pigmento difusible se debe a que la mayoría de actinomicetos, entre ellos los *Streptomyces*, es capaz de producir metabolitos secundarios en forma de pigmentos difusibles (Baltz, 2006). Al respecto, y con resultados similares a los obtenidos en la presente investigación, Pacheco, (2016) logró obtener un 62,5 por ciento de actinomicetos aislados con capacidad de producir pigmentos difusibles. Mientras que Chamorro (2018), reporta que solo

el 20 por ciento de cepas que logró aislar presentaron producción de pigmento; siendo dichos resultados menores en un 11 por ciento a los obtenidos en la presente investigación.



**Figura 14. Porcentaje de las cepas de actinomicetos basado en la Coloración de Pigmento Difusible**

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 14, se logró identificar que los colores de pigmento más frecuentes fueron el verde oscuro con 29 por ciento y el amarillo marrón con 29 por ciento, seguido de un 7 por ciento color violeta y 5 por ciento color rojo anaranjado, además el 31 por ciento no presentó color. La cepa control CS080 presentó coloración de pigmento difusible azul. Según diversos autores afirman que los actinomicetos poseen capacidad de producir pigmentos difusibles, como es el caso de León *et al.*, (2011) quienes reportaron la liberación de pigmento difusible a partir de cepas aisladas de actinomicetos, obteniendo los cuales varían en los colores amarillo en un 3 por ciento, verde en un 3 por ciento, rojo en un 10 por ciento, y un 20 por ciento no presentó pigmento. De igual forma Ugarte (2016), reportó la producción de pigmento difusible de color rojo en una de las cepas de actinomiceto que logró aislar. A partir de lo reportado anteriormente se puede afirmar que uno de los colores que se encuentra con mayor porcentaje en los pigmentos difusibles es el rojo, mientras en la presente investigación el color con mayor porcentaje fue el verde oscuro. Tales diferencias se pueden deber a la extensa variaciones fenotípicas y genotípicas que presentan los actinomicetos (Bergey, 2000).

#### 4.2.2 Caracterización microscópica

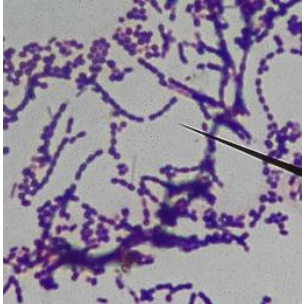
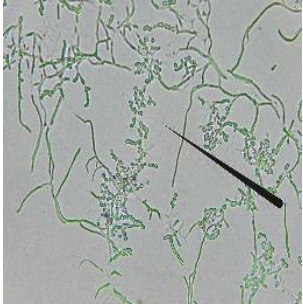
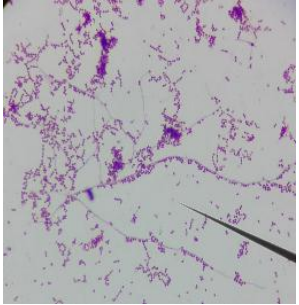
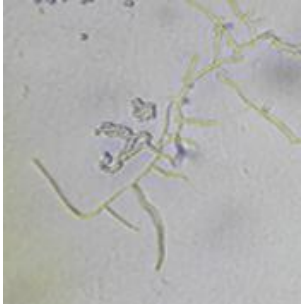
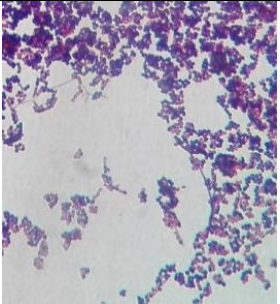

Se realizó la tinción Gram a las cepas aisladas y se observó que el 100 por ciento de las cepas aisladas se tiñeron de color azul-violeta, siendo esta la característica propia de las bacterias Gram positivas. La cepa control CS080 luego de la tinción Gram presentó color azul – violeta, lo cual lo incluye en el grupo de las Gram positivas. Lo anteriormente mencionado se explica debido a que los Actinomicetos tienen una pared celular rígida y gruesa formada en un 90 por ciento por peptidoglucano, copolímero formado por una secuencia alternante de N-acetil-glucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos por enlaces  $\beta$  1-4 (Bergey *et al.*, 2012).

En la Tabla 1 se muestran los resultados de los microcultivos en donde el 93 por ciento del total de las cepas aisladas se identificaron como pertenecientes al género *Streptomyces*. Esto concuerda con Salazar y Ordoñez quienes lograron identificar cepas de actinomicetos pertenecientes al género *Streptomyces*. Estas similitudes se pueden deber a la presencia de características como la no fragmentación del micelio de sustrato, la fragmentación del micelio aéreo y la formación de cadenas de conidias en forma de cocos y bacilos en disposición de espiral que presentan las cepas de actinomicetos del género *Streptomyces* (Dworkin, 2006; Prescott, 2002; Locci, 1989). Según Taddei *et al.*, (2006), entre los géneros de actinomicetos, el género *Streptomyces* está representado en la naturaleza por el mayor número de especies y variedades, lo cual corrobora que la especie de actinomiceto que mayor porcentaje obtuvo en la presente investigación fue *Streptomyces*.

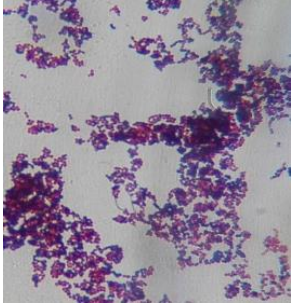
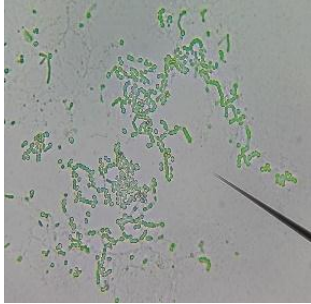

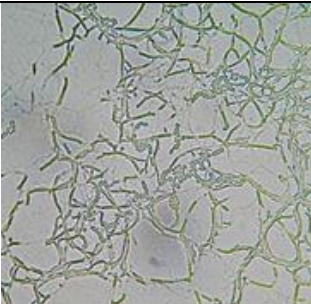
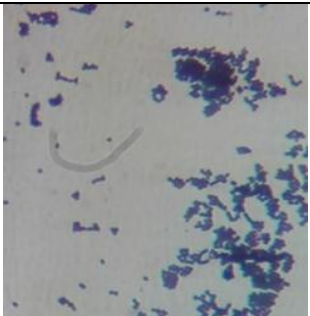

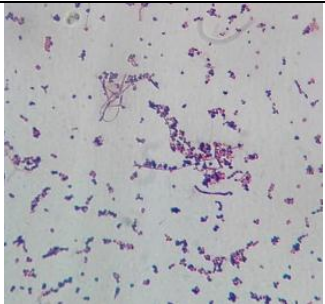
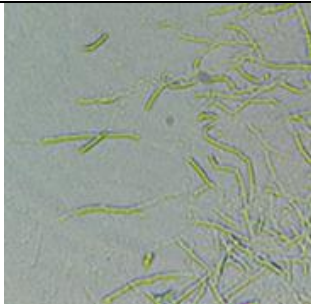
Las cepas P024, P032 y P042, las cuales representan el 7 por ciento del total de las cepas, se pueden identificar dentro del género de *Nocardia*, ya que desarrollaron un micelio de sustrato que se fragmenta con facilidad a formas bacilares y elementos cocoides, además se observó un micelio aéreo que se eleva por encima del sustrato (Prescott, 2002). También se pudo observar que, en la mayoría de las cepas, las hifas no eran septadas y de forma de espiral, siendo esta una característica propia de los estreptomicetos presentes en hifas vegetativas (Kampfer *et al.*; 2012). Escobar *et al.*; (2012), reportaron la presencia de actinomicetos del género *Nocardia* en cantidades leves a moderadas respectivamente, en gallinaza de aves de corral, lo cual ratifica la presencia de *Nocardia* en menor porcentaje, obtenido en la investigación.



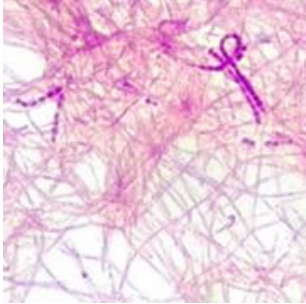
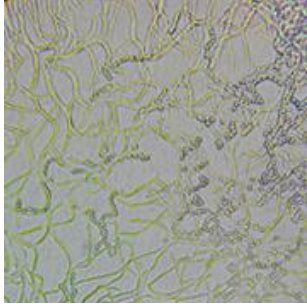
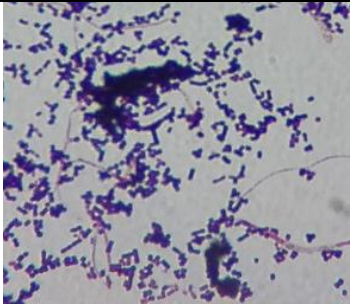
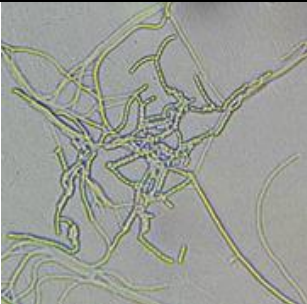
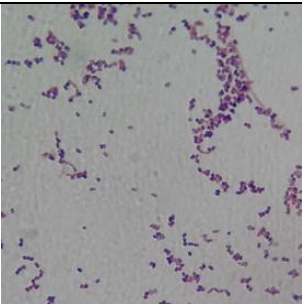
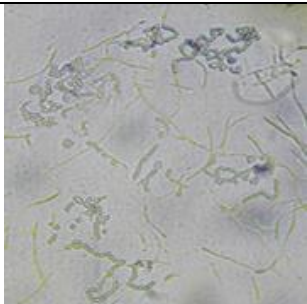
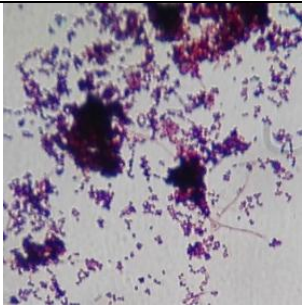
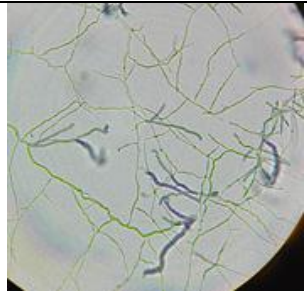
**Tabla 1: Características microscópicas de actinomicetos aislados del tracto gastrointestinal de gallinas criollas**

<b>CEPA</b>	<b>Tinción Gram</b>	<b>Microcultivo</b>	<b>Posible género</b>
<b>P001</b>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma ondulada</p>	<i>Streptomyces</i>
<b>P002</b>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, esporas dispuestas en haz</p>	<i>Streptomyces</i>
<b>P003</b>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, estructura portadora de esporas en forma ondulada</p>	<i>Streptomyces</i>

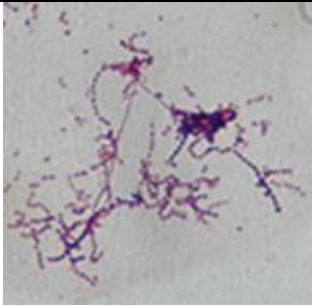
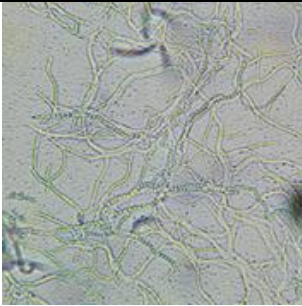
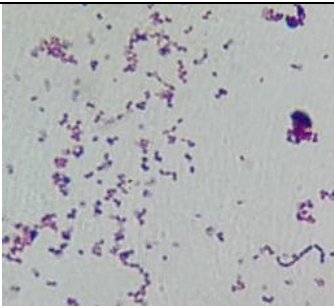

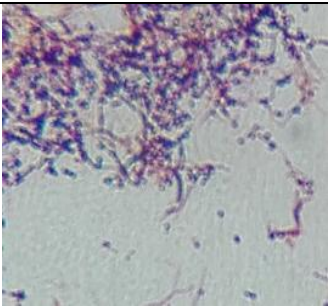

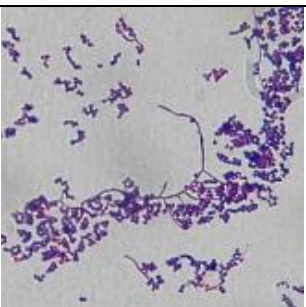
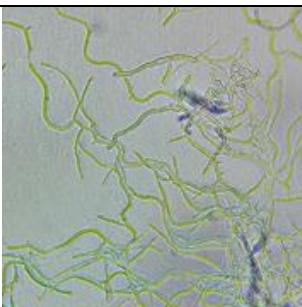
Continuación...

<p><b>P004</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Estructura portadora de esporas en forma ondulada</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P005</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, estructura portadora de esporas en forma ondulada</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P006</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma ganchos</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P007</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, estructura portadora de esporas en forma recta</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>

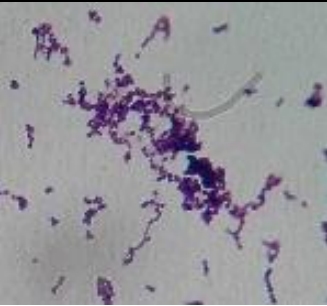
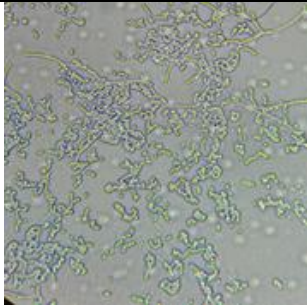
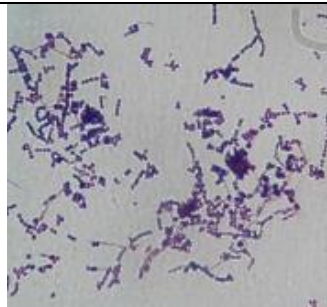
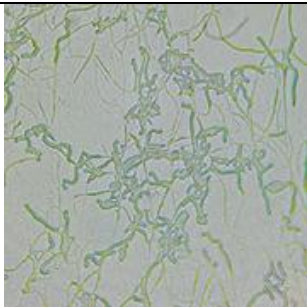
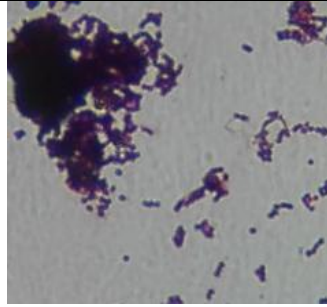
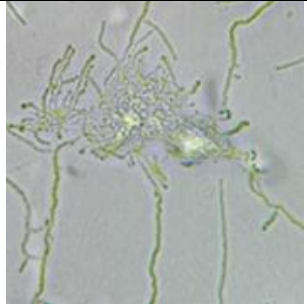
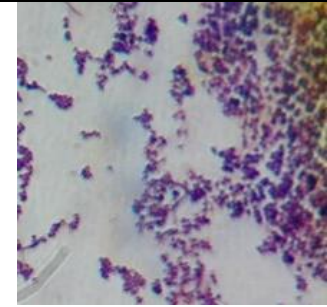
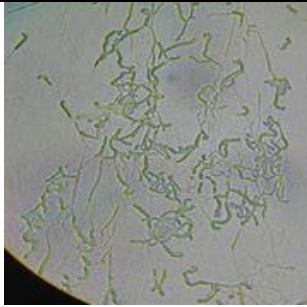
Continuación...

<p><b>P008</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma ondulada</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P009</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma de espirales abiertas</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P010</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, estructura portadora de esporas en forma ondulada</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P011</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, estructura portadora de esporas en forma ondulada</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>


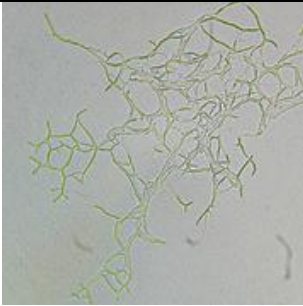
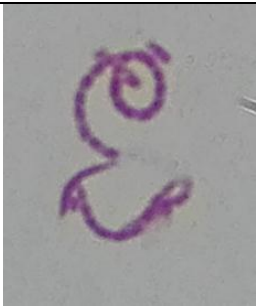

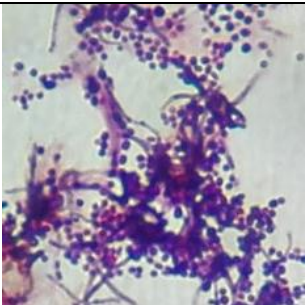
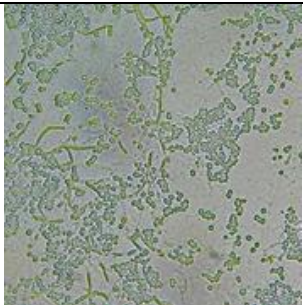

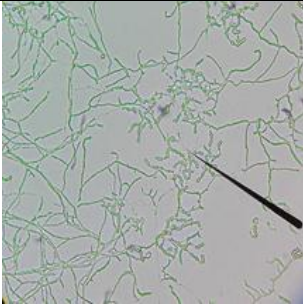
Continuación...

<b>P012</b>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, estructura portadora de esporas en forma ondulada</p>	<i>Streptomyces</i>
<b>P013</b>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma recta</p>	<i>Streptomyces</i>
<b>P014</b>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, estructura portadora de esporas en forma ondulada</p>	<i>Streptomyces</i>
<b>P015</b>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma ondulada</p>	<i>Streptomyces</i>


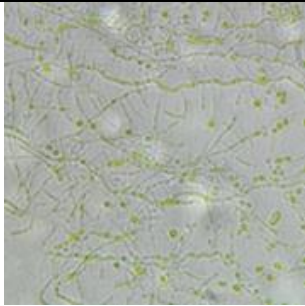
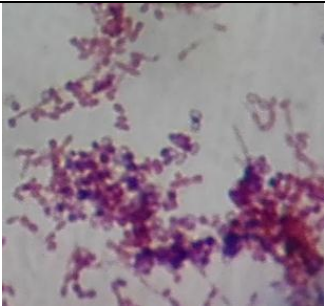
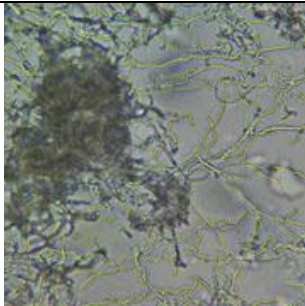
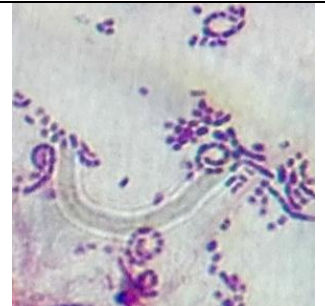
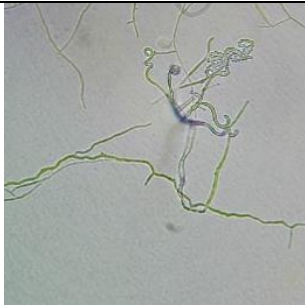
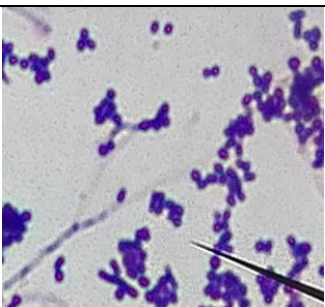

Continuación...

<p><b>P016</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma ondulada</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P017</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, estructura portadora de esporas en forma de ganchos y bucles abiertos</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P018</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, estructura portadora de esporas en forma recta</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P019</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, estructura portadora de esporas en forma gancho y bucles abiertos.</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>

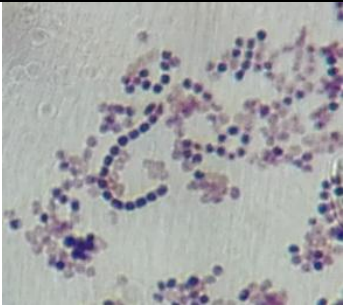
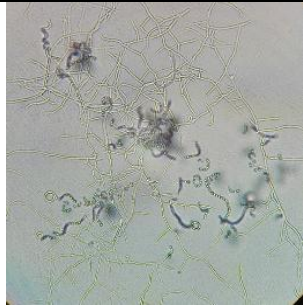
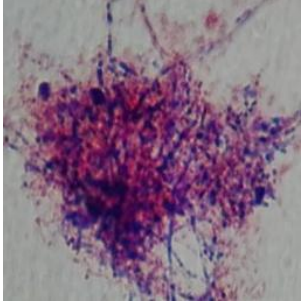
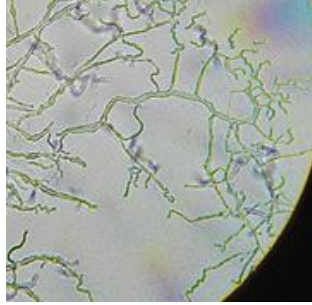
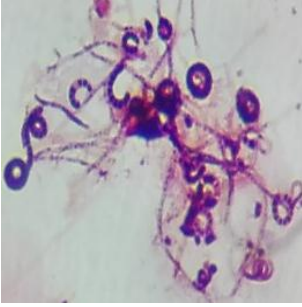
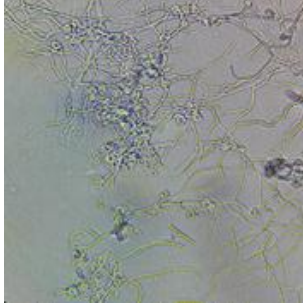
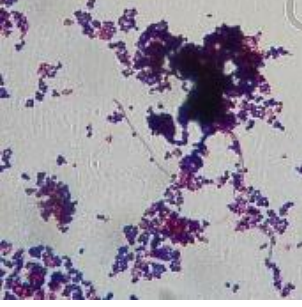
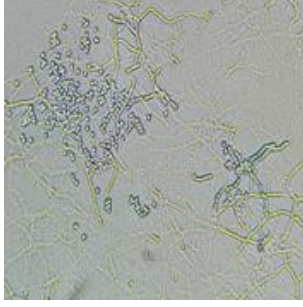
Continuación...

<p><b>P020</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma recta</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P021</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>estructura portadora de esporas</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P022</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, estructura portadora de esporas en forma recta</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P023</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma ondulada</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>

Continuación...


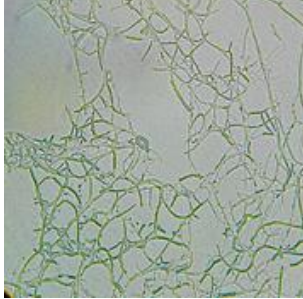
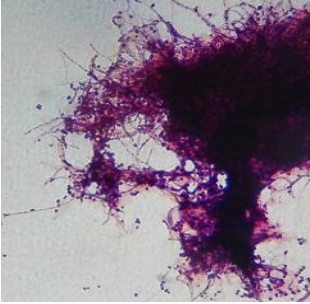
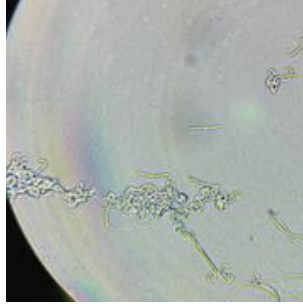
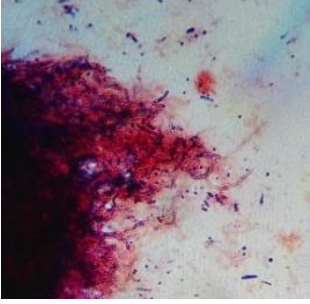

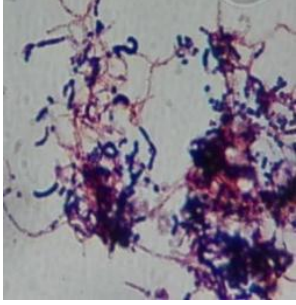
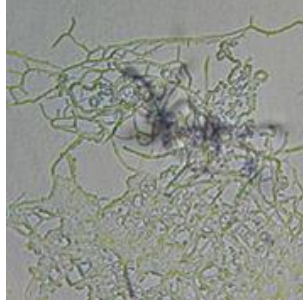
<p><b>P024</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, presencia de esporas dispersas</p>	<p><i>Nocardia</i></p>
<p><b>P025</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, estructura portadora de esporas en forma bucles abiertos.</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P026</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma de esbozo de espirales y gancho.</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P027</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma haz.</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>

Continuación...

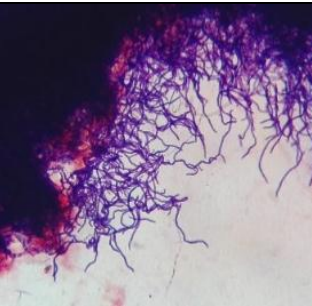
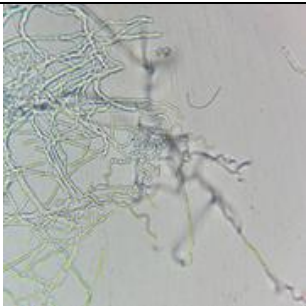
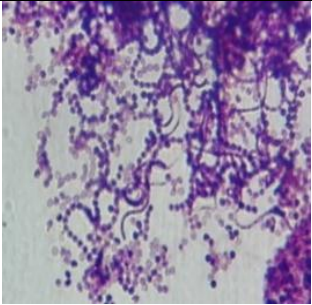
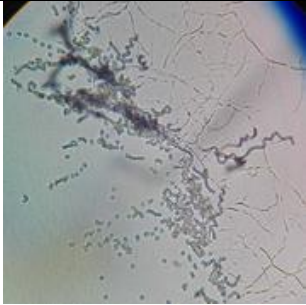
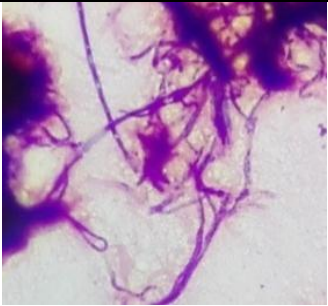
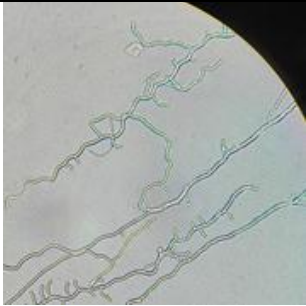
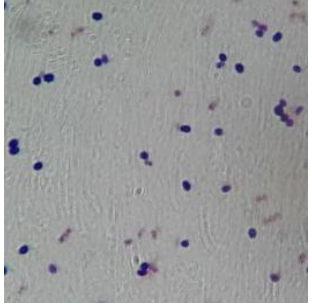
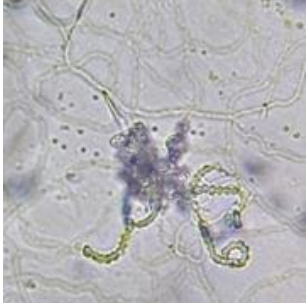
<p><b>P028</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma de espirales abiertas</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P029</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, estructura portadora de esporas en forma ondulada</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P030</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma de espirales cerradas</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P031</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma recta</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>



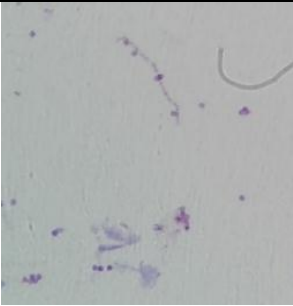

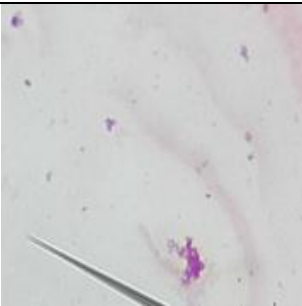

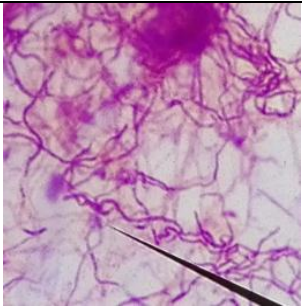
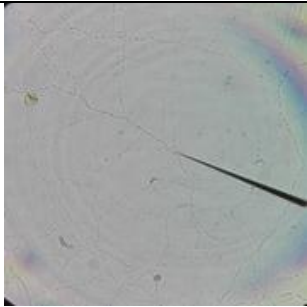
Continuación...

<p><b>P032</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, presencia de esporas dispersas</p>	<p><i>Nocardia</i></p>
<p><b>P033</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma de espirales cerradas</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P034</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas con forma recta</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P035</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma de bucles abiertos</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>

Continuación...

<p><b>P036</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma de espirales abiertas</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P037</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, estructura portadora de esporas en forma de espirales abiertas</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P038</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma ondulada</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>
<p><b>P039</b></p>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio no fragmentado, estructura portadora de esporas en forma de bucles abiertas</p>	<p><i>Streptomyces</i></p>

Continuación...

<b>P040</b>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio fragmentado, estructura portadora de esporas en forma de bucles abiertos</p>	<i>Streptomyces</i>
<b>P041</b>	 <p>Gram +</p>	 <p>Estructura portadora de esporas en forma recta</p>	<i>Streptomyces</i>
<b>P042</b>	 <p>Gram +</p>	 <p>Micelio sustrato fragmentado</p>	<i>Nocardia</i>

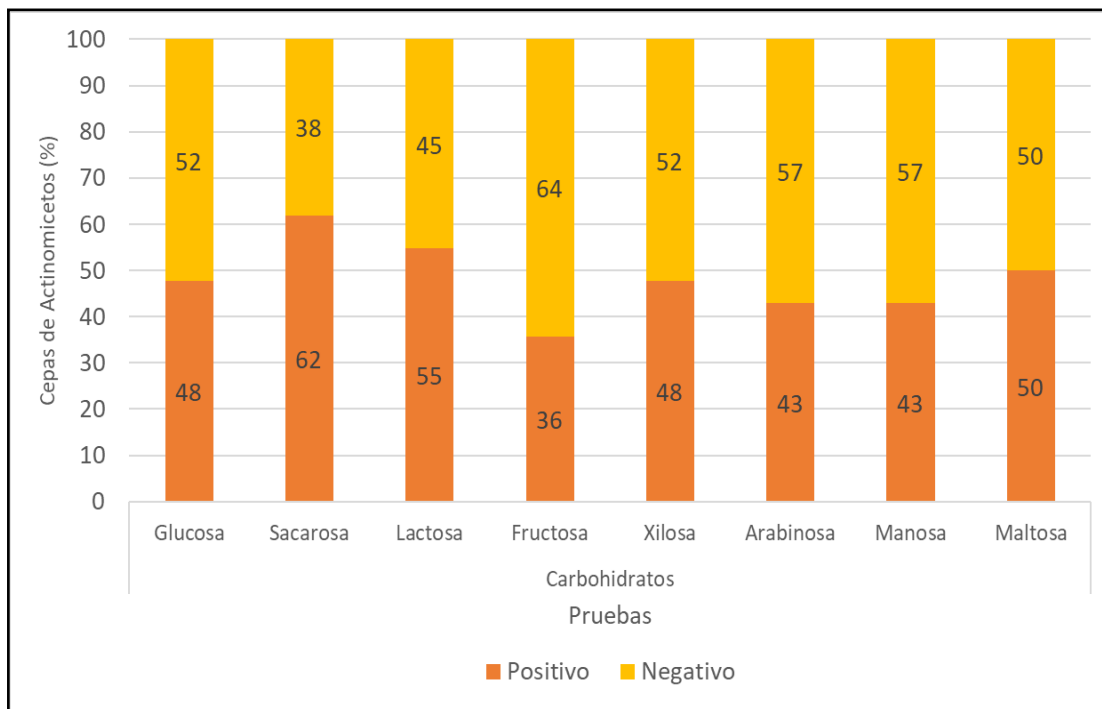
\* Todas las lecturas fueron realizadas con microscopio binocular a 100x de objetivo.

Fuente: Elaboración propia

### 4.3 Caracterización bioquímica

La caracterización bioquímica de los actinomicetos, nos permitió diferenciar las preferencias de cada microorganismo sobre las diferentes fuentes de carbono, con el fin de mejorar la fórmula de enriquecimiento que estimule la producción de sus metabolitos bioactivos. (Kämpfer *et al.* 2012). En la Figura 15 se muestran los resultados de la evaluación de las 42 cepas de actinomicetos para determinar la utilización de la fuente de carbono. Del total de cepas: 26 que representan el 62 por ciento utilizaron la sacarosa como fuente de carbono, 23 (55 por ciento) utilizaron la lactosa como fuente de carbono, 21 (50 por ciento) cepas que utilizaron la maltosa, 20 (48 por ciento) cepas utilizan la glucosa, 20 (48 por ciento) cepas utilizaron la xilosa como fuente de carbono, 18 (43 por ciento) cepas utilizaron arabinosa como fuente de carbono, 18 (43 por ciento) cepas utilizan manosa como fuente de carbono, 15 (36 por ciento) cepas que utilizan fructosa como fuente de carbono (Anexo 8). La cepa control CS080 utilizó como fuente de carbono arabinosa, fructosa, glucosa, manitol, sacarosa y xilosa.

Existen gran variedad de autores que demuestran la capacidad de los actinomicetos para utilizar diferentes fuentes de carbono como fuente de sustrato, entre ellos Taddei *et al.*, (2006) quienes en su investigación probaron la capacidad que poseen los actinomicetos para la utilización de carbohidratos como arabinosa, sacarosa, xilosa y fructosa. Un resultado semejante ha sido descrito previamente por Mohamed *et al.*, (2017) quienes también probaron que los actinomicetos aislados eran capaces de hidrolizar arabinosa, fructosa, glucosa y xilosa. Pacheco, (2016) en su investigación probó las cepas de actinomicetos aislados eran capaces de fermentar glucosa, lactosa y sacarosa. Asimismo, en los estudios realizados por Boudjeko *et al.*, (2017) demostraron la existencia de cepas de *Streptomyces* capaces de utilizar carbohidratos como arabinosa. Mientras que, en los estudios reportados por Sastoque, *et al.*, (2007) también se lograron obtener resultados positivos sobre la utilización de glucosa y fructosa, pero con resultados negativos para la utilización de sacarosa, arabinosa y xilosa. Si bien es cierto que existe diferencia de lo reportado, por los autores anteriormente nombrados, con lo obtenido en este trabajo, pueda ser debido a que los *Streptomyces* presentan resultados muy variantes en su actividad bioquímica, lo cual podría deberse a la gran variedad de actinomicetos que existen y a sus características propias por especie (Franco, 2008).



**Figura 15. Porcentaje de las cepas de Actinomicetos basado en pruebas bioquímicas**

Fuente: elaboración propia

#### 4.4 Determinación de la afinidad metabólica del efecto de granos andinos sobre la producción de esporas de actinomicetos

En la Figura 16 se observan los resultados obtenidos en las pruebas sobre los diferentes medios de cultivo para actinomicetos formulados en base a granos andinos, en lo cual se obtuvo que el mayor porcentaje de crecimiento fue sobre el medio agar kiwicha con el 98 por ciento de las cepas, seguido de agar quinua con 95 por ciento, agar maíz con 95 por ciento y con menor porcentaje el agar cañihua con 93 por ciento. La cepa control CS080 presentó crecimiento sobre agar quinua. En la Tabla 2, se puede observar que el mejor medio de cultivo para una esporulación abundante fue el medio kiwicha con 14 cepas de actinomicetos, seguido del medio cañihua con 5 cepas (Anexo 10). Se hace necesario resaltar que las colonias de actinomicetos exhiben características diferentes en los medios empleados, ya que el crecimiento, desarrollo y morfología de los microorganismos depende de las fuentes de carbono que componen cada medio de cultivo (Franco, 2008). Es por ello que la composición de la dieta es uno de los principales determinantes de la diversidad microbiana en las diferentes porciones del tracto intestinal (Apajalahti *et al.*, 2002).

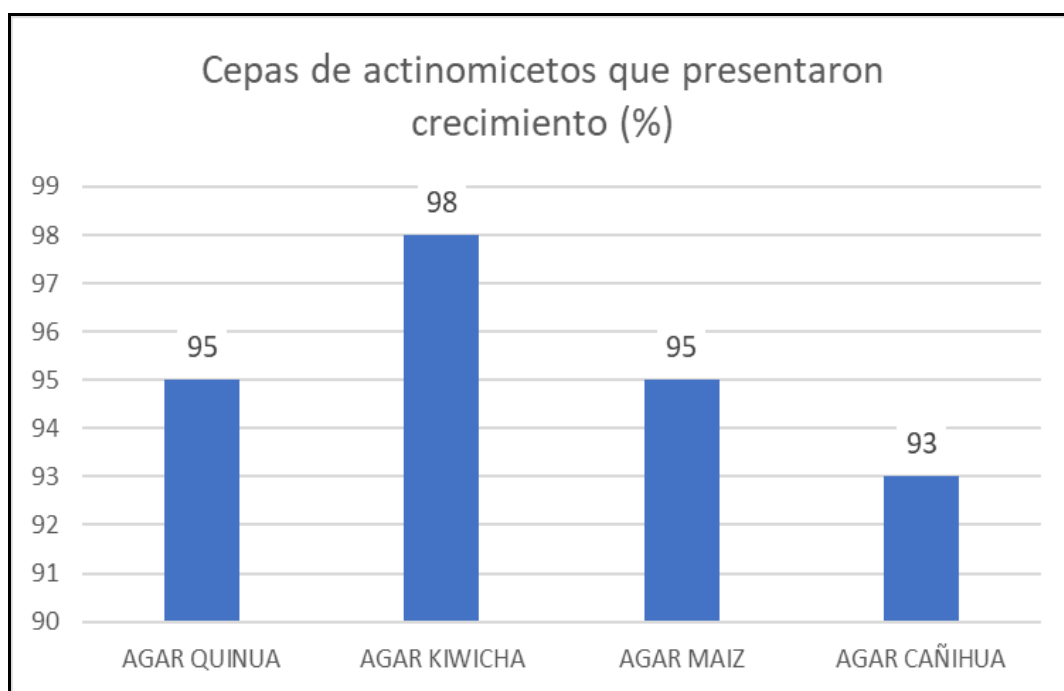


Figura 16. Porcentaje de cepas de Actinomicetos que presentaron crecimiento (%)

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo a lo anteriormente nombrado, la preferencia de las cepas de actinomicetos aislados de gallinas criollas, sobre el agar quinua se puede explicar debido a que esta posee la cantidad más alta de glucosa en su composición, lo cual corrobora con los estudios de Romo *et al.*, (2006) quienes determinaron que la composición de carbohidratos totales de la quinua es de 76.2 por ciento, a su vez se sabe que la kiwicha posee un 69.1 por ciento de carbohidratos totales (Reyes *et al.*, 2009), mientras que la cañihua tiene entre 63 y 66 por ciento de carbohidratos totales (Repo-Carrasco *et al.*, 2003). Además, en adición a los polisacáridos, los granos de quinua y cañihua también poseen azúcares libres en pequeñas cantidades. Cabe resaltar que los cultivos andinos tienen un contenido más alto en azúcares que los granos comunes (Mera, 2018) (Tabla 3).

**Tabla 2:** Cantidad de cepas que presentaron esporulación sobre diferentes medios de cultivo

Medios de cultivo	Esporulación			
	Abundante	Moderado	Escaso	Sin esporulación
Agar kiwicha	14	15	7	6
Agar cañihua	5	19	13	5
Agar quinua	0	15	19	8
Agar maíz	0	16	22	4

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 3:** Contenido de azúcares en los granos andinos (g/100 g materia seca)

Grano andino	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Maltosa
Quinua	1.70	0.20	2.90	1.40
Cañihua	1.80	0.40	2.60	1.70
Kiwicha	0.75	0.20	1.30	1.30

FUENTE: Repo-Carrasco *et al.*, 2003

#### 4.5 Determinación de la actividad antagónica

Entre los principales patógenos que causan enfermedades en el ave se encuentran *Salmonella* spp., *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, los cuales pueden causar enfermedades en los consumidores (Mercado *et al.*, 2012); además de ocasionar grandes pérdidas e incremento de costos en la producción.

De las 42 cepas de actinomicetos aislados, 12 presentaron efecto inhibitorio. Según las pruebas realizadas la cepa P004 presentó un halo de inhibición de 14 mm de diámetro frente a *Pseudomonas*, P009 con un halo de inhibición de 21 mm frente a *Staphylococcus* y 18mm frente a *Listeria*, P011 con un halo de 14mm frente a *Pseudomona*, P025 con un halo 13 mm frente a *Staphylococcus* y *Listeria*, P026 con un halo de 11 mm frente a *Listeria*, P030 con un halo de 32 mm frente a *Staphylococcus*, 15 mm frente a *Pseudomonas* y 30 mm frente a *Listeria*, P032 con diámetro de halo de 13 mm frente a *E. coli* y 9 mm frente a *Klebsiella*, P034 con diámetro de halo de 13 mm frente a *Pseudomona* y 11 mm frente a *Listeria*, P035 con diámetro de halo de 13 mm *Staphylococcus*, 11mm frente a *Pseudomonas* y 11mm frente a *Listeria*, P036 con diámetro de halo de 11 mm frente a *Pseudomonas*, P038 con diámetro de halo de 13 mm frente a *Staphylococcus* y la cepa P041 con diámetro de halo de 12 mm frente a *Staphylococcus* y 16 mm frente a *Listeria* (Tabla 4) (Figura 17). La cepa control CS080 presentó efecto bacteriostático frente a *Listeria* y *Staphylococcus*.

León *et al.*, (2016) Identificó cepas de actinomicetos capaces de inhibir patógenos -resistentes como *S. aureus* metilcilina resistente; en el estudio se corroboró dicha información al encontrarse que una de las enterobacterias con predominio de inhibición fue la *S. aureus*. Mohamed *et al.*, (2017), también probó la actividad antagonista de un actinomiceto sobre *K. pneumoniae*, el cual presentó la máxima zona de inhibición con 15 mm y la mínima de 14 mm, *E. coli* con un rango de inhibición de 10 a 34 mm y *S. aureus* con rango de 12 a 35 mm. Comparando con las investigaciones anteriores, se puede corroborar que las cepas de actinomicetos presentaron actividad inhibitoria frente a *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *E. coli*. Además, según los resultados obtenidos, los rangos de los diámetros de inhibición se encuentran dentro de los obtenidos por los autores anteriormente nombrados.



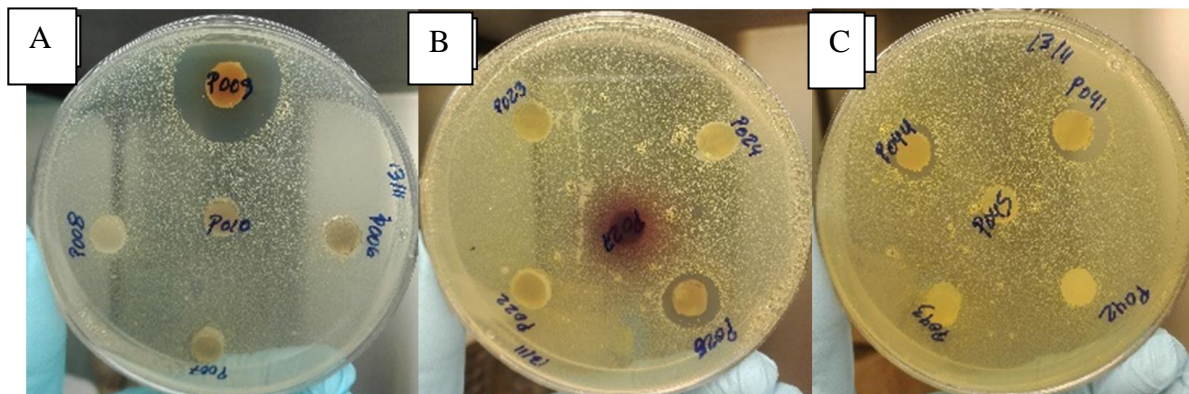


Figura 17: Zonas de transparencia o halos de inhibición contra *S. aureus* por parte de los aislamientos P009 (A), P025 (B), P041 (C) y P038 (C), que presentaron la mejor eficiencia de antagonismo

Fuente: Elaboración propia

Tabla 4. Resultados de enfrentamientos de enterobacterias contra Actinomicetos

Cepa	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Pseudomona</i>	<i>Listeria</i>
P004	-	-	-	14 mm	-
P009	-	-	21 mm	-	18 mm
P011	-	-	-	14 mm	-
P025	-	-	13 mm	-	13 mm
P026	-	-	-	-	11 mm
P030	-	-	32 mm	15 mm	30 mm
P032	13 mm	9 mm	-	-	-
P034	-	-	-	13 mm	11 mm
P035	-	-	13 mm	11 mm	11 mm
P036	-	-	-	11 mm	-
P038	-	-	13 mm	-	-
P041	-	-	12 mm	-	16 mm

\* (-): no presentó halo \*\*mm: milímetros

Fuente: Elaboración propia

## V. CONCLUSIONES

- En el ave número dos se aislaron 42 cepas con características propias de actinomicetos del tracto digestivo y heces de gallinas criollas de Querocoto-Chota-Cajamarca. De las cuales 31 cepas (74 por ciento) se aislaron del ciego, 3 cepas (7 por ciento) de la cloaca, 2 cepas (5 por ciento) del íleon y 6 cepas (14 por ciento) de heces.
- De las 42 cepas de actinomicetos aislados de gallinas criollas, el 81 por ciento del total de las cepas presentó textura pulverulenta, 10 por ciento tizosa, 5 por ciento seca y 5 por ciento aterciopelada, de acuerdo a las características macroscópicas. Y el 31 por ciento no produce pigmento difusible, mientras que el 69 por ciento si lo produce.
- Según las características morfológicas y fisiológicas de las cepas aisladas de actinomicetos, el 93 por ciento pertenecen al género *Streptomyces* y el 7 por ciento al género *Nocardia*.
- En lo que respecta a las características bioquímicas, el 62 por ciento de las cepas aisladas de actinomicetos presentan preferencia por la sacarosa como fuente de carbono; mientras que el 36 por ciento por la fructosa.
- Los medios de cultivo preparados a base de quinua, kañihua, kiwicha y maíz, presentaron buenas condiciones para determinar cualitativamente el crecimiento y esporulación de los actinomicetos, obteniéndose un 98 por ciento del crecimiento de las cepas en el medio de cultivo a base de kiwicha y el 33 por ciento presentaron una esporulación abundante en el medio de cultivo a base de kiwicha.
- La cepa de actinomicetos P030 tuvo un mayor efecto inhibitorio (32 mm) en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar técnicas moleculares a través de la región conservada del 16SrDNA y 23SrRNA para complementar y corroborar la identificación de los actinomicetos aislados del tracto digestivo de gallinas criollas.
2. Continuar con la evaluación de medios de cultivo a base de granos andinos u otros productos naturales propios de nuestro país, que permitan mejorar la producción de metabolitos secundarios de los actinomicetos.
3. Continuar con los ensayos *in vitro* e *in vivo* para demostrar las propiedades probióticas de los actinomicetos aislados de gallinas criollas, con la capacidad de poder ser utilizados en beneficio de la industria avícola.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdulla, H. M., & El-Shatoury, S. A. (august,2006). Actinomycetes in rice straw decomposition. Waste Management 27(6), 850-853. Doi: 10.1016/j.wasman.2006.06.006
2. Abad-Guamán, R. M., Capa-Morocho, M., Yunga, V. H., Herrera, R. H., & Sanchez, G. E. (noviembre, 2018). Cambios en la microbiota intestinal de las aves y sus implicaciones prácticas. Centro de Biotecnología 6(1), 98-108. Recuperado de <http://revista.uni.edu.ec/index.php/biotecnologia>
3. Aguavil, J. C. (2012). Evaluación del efecto de un probiótico 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 (Informe técnico de proyecto de investigación, Escuela politécnica del ejército). Recuperada de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5213/1/T-ESPE-IASA%20II%20-%20002399.pdf>
4. Amit-Romach, E., Sklan, D., & Uni, Z. (January, 2004). Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. Journal of Poultry Science, 83(7), 1093-1098. Recuperado de <https://watermark.silverchair.com/poultrysci83-1093.pdf>
5. Angulo, E. (2009). Fisiología aviar. España. Ediciones de la Universidad de Lleida.
6. Apajalahti, J., & Kettunen, A. (diciembre, 2018). XVIII Curso de Especialización FEDNA 2002. Efecto de la dieta sobre la flora microbiana en el tracto gastrointestinal de aves. Barcelona, España. Recuperado de

[https://www.researchgate.net/profile/Anu\\_Kettunen/publication/28179835\\_Efecto\\_de\\_la\\_dieta\\_sobre\\_la\\_flora\\_microbiana\\_en\\_el\\_tracto\\_gastrointestinal\\_de\\_aves](https://www.researchgate.net/profile/Anu_Kettunen/publication/28179835_Efecto_de_la_dieta_sobre_la_flora_microbiana_en_el_tracto_gastrointestinal_de_aves)

7. American Veterinary Medical Association (AVMA). (2001). Report of the AVMA panel on euthanasia. 218(5), 669-696.
8. Baltz, R. H. (July, 2006). Marcel Faber Roundtable: is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(7), 507-513. Doi: 10.1007/s10295-005-0077-9
9. Barragán C., J. I. (2011). Él buche como un importante elemento de control de patógenos encanales de pollo. *Asociación Española de Ciencia Avícola*. 50-53.
10. Behal, V. (2000). Bioactive products from *Streptomyces*. *Adv. Appl. Microbiol.* 47,113-157.
11. Benavides Rodríguez, G. D., & Hermida Silva, A. M. (2008). Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los Páramos Cruz Verde y Guasca – Cundinamarca (Tesis de Biólogo Industrial, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Colombia, Bogotá) recuperada de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8610/tesis145.pdf?sequence=1>
12. Bergey, J. (2000). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. Editorial William and Wilkins. Baltimor Filadelfia, USA. Recuperado de [https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=3znhBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&dq=12.%09Bergey,+J.+\(2000\).+Bergey%27s+Manual+of+Systematic+Bacteriology.+Vol+2.+Editorial+William+and+Wilkins.+Baltimor+Filadelfia,+USA.](https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=3znhBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&dq=12.%09Bergey,+J.+(2000).+Bergey%27s+Manual+of+Systematic+Bacteriology.+Vol+2.+Editorial+William+and+Wilkins.+Baltimor+Filadelfia,+USA.)

13. Blajman, J. E., Zbrun, M. V., Astesana, D. M., Berisvil, A. P., Scharpen, A. R., Fusari, M. L., & Frizzo, L. S. (december, 2015). Probióticos en pollos parrilleros: una estrategia para los modelos productivos intensivos. *Revista argentina de microbiología*, 47(4), 360-367. Doi: 10.1016/j.ram.2015.08.002
14. Boudjeko, T., Tchinda, A. M., Zitouni M., Nana, J. A. V. T., Lerat, S., & Beaulieu, C. (march, 2017). *Streptomyces cameroonensis* sp. nov., a Geldanamycin producer that promotes *Theobroma cacao* growth. *Microbes and environments*, 32(1), 24-31. doi: 10.1264/jsme2.ME16095
15. Cisneros, M. (2002). Aves de traspatio modernas en el Ecuador. *Avicultura familiar*. FAO, 62.
16. Coloe, P. J., Bagust, T. J., & Ireland, L. (august, 1984) Development of the normal gastrointestinal microflora of specific pathogen-free chickens. *The Journal of Hygiene* 92(1), 79-87. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2129363/pdf/jhyg00016-0081.pdf>
17. Clavijo, V., & Flórez, J. V. (march, 2017). The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poultry Science*, 97(3), 1006-1021. Recuperado de <https://academic.oup.com/ps/article/97/3/1006/4739542>
18. Cuca, M., & Ávila, E. (1996). *Alimentación de las aves*. Universidad Autónoma de Chipango, México. 150 p.
19. Chamorro, J. P. (2018). *Caracterización fenotípica de actinomicetes aislados de suelos contaminados con hidrocarburos*. (Tesis de bachiller, Universidad Técnica de Ambato). Recuperada de <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/28373>

20. Davies, J., & Davies, D. (september, 2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews* 74(3), 417-433. Doi: 10.1128/MMBR.00016-10
21. Dávila, M., Gallegos, G., Hernández, F., Ochoa, Y., & Flores, A. (mayo, 2013). Actinomicetos antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(8), 1187-1196. Recuperada de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342013000800006](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342013000800006)
22. Denbow, D. M. (2015). Gastrointestinal anatomy and physiology: In *Sturkie's avian physiology*. Academic Press. 337-366. Doi: 10.1016/B978-0-12-407160-5.00014-2
23. Días-López, E., Ángel-Isaza, J., & Ángel, D. (january, 2017). Probióticos en la avicultura: una revisión. *Revista Médica Veterinaria* (35), 175-189. doi: 10.19052/mv.4400.
24. Dworkin, M. (2006). The Prokaryotes: Proteobacteria: delta and epsilon subclasses. Deeply rooting bacteria. Recuperado de [https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=L-cCqW4IVj0C&oi=fnd&pg=PR6&dq=24.%09Dworkin,+M.+\(2006\).+The+Prokaryotes:+Proteobacteria:+delta+and+epsilon+subclasses.+Deeply+rooting+bacteria&ots=ZAKPmBUOZ1&sig=CCWyLbxOUzp6SujzI1K9SikeDIQ&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=L-cCqW4IVj0C&oi=fnd&pg=PR6&dq=24.%09Dworkin,+M.+(2006).+The+Prokaryotes:+Proteobacteria:+delta+and+epsilon+subclasses.+Deeply+rooting+bacteria&ots=ZAKPmBUOZ1&sig=CCWyLbxOUzp6SujzI1K9SikeDIQ&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
25. Escobar N., Mora, J., Jola, R., & Jaime, N. (june, 2012). Identification of Microbiological Population in organic wasted compost from coffee in Cundinamarca (Colombia). *Centro de Museos. Museo de Historia Natural* 16(1), 75-88. Recuperado de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-30682012000100006&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-30682012000100006&script=sci_arttext&tlng=pt)

26. Ezziyyani, M., Hamdache, P. C., Requena, M., Rubio, L., & Candela, M. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*, (26),69-78. Recuperado de <https://revistas.um.es/analesbio/article/view/30471>
27. FAO (Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2003. Cría de aves de corral, un salvavidas para los campesinos. Recuperado de <http://www.fao.org/spanish/newsroom/news/2003/13201-es.html>
28. Franco Correa, M. (2008). Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. (Tesis doctoral, Universidad de Granada) recuperada de <https://hera.ugr.es/tesisugr/17716093.pdf>
29. Franco, M. (diciembre, 2009). Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Revista Peruana de Biología*, 16(2), 239-242. Doi: 10.15381/rpb.v16i2.213
30. Franco, M., Gómez, D., Castro, N., & Rendón, M. (2009). Polihidroxicanoatos en actinomicetos nativos de suelos colombianos. *Revista Peruana de Biología*. 16(1), 115-118. Recuperado de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-99332009000100015](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332009000100015)
31. Fuller, R. (january, 1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. (66), 365-378. Recuperado de <http://performanceprobiotics.com/Downloads/Articles/Fuller%201989%20Probiotics%20in%20man%20and%20animals.pdf>
32. Gamarra, R. M. (2017). Comparación de índices productivos y análisis económico al suplementar en la ración de pollos de carne con ácidos orgánicos y Halquinol. (Tesis de maestría, Universidad Nacional Agraria la Molina). Recuperada de



<http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3129/L02-G35-T.pdf?sequence=5&isAllowed=y>

33. Granados, J. (2008). Factores que influyen en la Integridad Intestinal del Broiler. AMEVEA. Quito-Ecuador.
34. Guevara, M. (2018). Caracterización de la gallina criolla y de sus sistemas de producción en dos cantones de la provincia de Chimborazo, Ecuador. (Tesis doctoral Universidad Nacional Agraria La Molina). Recuperada de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3507/guevara-palacios-mauro-ivan.pdf?sequence=1>
35. González, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A., & Genilloud, O. (may, 2005). Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS microbiology ecology*, 54(3), 401-415. Doi: 10.1016/j.femsec.2005.05.004
36. Goodfellow, M., & Cross, T. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Biology of the Actinomycetes Classification*. Academic Press Inc. London. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/journal/systematic-and-applied-microbiology/vol/5/issue/2>
37. Hughes, R. (december, 2005). An integrated approach to understanding gut function and gut health of chickens. *Asia Pac. Journal Clin. Nutr.* 14, 27. Recuperado de <https://search.proquest.com/openview/7466dda609e3b5accca7775f27dc4591/1?pq-origsite=gscholar&cbl=45812>
38. Jerez-Salas, M. P., González-Martínez, A., Haro, G. H., Vásquez-Dávila, M. A., Correa, J. S., & Villegas-Aparicio, Y. (2009). Mercadeo de huevos de gallinas criollas

- (*Gallus gallus L.*) en los valles centrales de Oaxaca, México. *Etnobiología*, 7(1), 86-93.  
Recuperado de <https://revistaetnobiologia.mx/index.php/etno/article/view/124>
39. Juárez, A. (octubre, 2001). Estudio de la incubabilidad y crianza en aves criollas de traspatio, rasgos de apariencia fenotípica en la avicultura rural de los municipios de la Ribera del Lago de Pátzcuaro. *Vet. Mex.* 32(1), 27-32. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=5942>
40. Kabir, S. M. (august, 2009). The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(8), 3531-3546. Doi: 10.3390/ijms10083531
41. Kämpfer, P., Goodfellow, M., & Whitman, W. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Actinobacteria*. Eds. New York: Springer. Recuperado de <https://books.google.com.pe/books?id=66UMS7A2KisC&pg=PA26&dq=41.+K%C3%A4mpfer,+P.;+Goodfellow,+M.;+Whitman,+W.+2012.+Bergey%27s+Manual+of+Systematic+Bacteriology:+The+Actinobacteria>
42. Kekuda, T., Shobha, S., & Onkarappa, R. (January, 2010). Fascinating diversity and potent biological activities of Actinomycete metabolites. *Journal of Pharmacy Research* 3(2), 250-256. Recuperado de <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.735.4927&rep=rep1&type=pdf>
43. Korver, D. (march, 2006). Overview of the immune dynamics of the digestive system. *Journal Appl. Poult. Res.* 15,123–135.doi: 10.1093/japr/15.1.123
44. Lan, Y., Verstegen, W. A., Tamminga, S., & Williams, B. A. (march, 2005). The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. *World's Poultry Science Journal* 61(1), 95-104. Doi: 10.1079/WPS200445

45. Latha, S., Vinothini, G., Calvin, D. J., & Dhanasekaran, D. (January, 2016). In vitro probiotic profile-based selection of indigenous actinobacterial probiont *Streptomyces* sp. JD9 for enhanced broiler production. *Journal of bioscience and bioengineering* 121(1), 124-131. Doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.04.019
46. León, J., Aponte, J., Cuadra, D., Galindo, N., Jaramillo, L., Vallejo, M., & Marguet, E. (April, 2016). Actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* productores de enzimas extracelulares y con actividad inhibitoria de patógenos marinos. *Revista de biología marina y oceanografía*. 51(1), 69-80. Doi: 10.4067/S0718-19572016000100007
47. León, J., Aponte, J. J., Rojas, R. Cuadra, D. L., Ayala, N., Tomás, G., & Guerrero, M. (Mayo, 2011). Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes y *Enterococcus faecalis* Vancomicina Resistentes. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(2), 237-246. Recuperado de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342011000200010&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342011000200010&script=sci_arttext&tlng=en)
48. León, J., Liza, L., Soto, I., Cuadra, D., Patiño, L., & Zerpa, R. (Diciembre, 2007). Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Revista peruana de Biología*. 14(2), 259-270. Recuperado de <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm>
49. Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. 2016. Morphological identification of actinobacteria. In *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications* IntechOpen. Recuperado de <https://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and-biotechnological-applications/morphological-identification-of-actinobacteria>

50. Loaiza, S., & Guerrero, O. (2013). Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. (Trabajo bachiller, Universidad Tecnológica de Pereira). Recuperada de [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/47747548/AISLAMIENTO\\_E\\_IDENTIFICACION\\_DE\\_ACTINOMICETOS\\_FIJADORES\\_DE\\_NITROGENO\\_EN\\_SU\\_ELO\\_DEL\\_JARDIN\\_BOTANICO\\_DE\\_LA.pdf](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/47747548/AISLAMIENTO_E_IDENTIFICACION_DE_ACTINOMICETOS_FIJADORES_DE_NITROGENO_EN_SU_ELO_DEL_JARDIN_BOTANICO_DE_LA.pdf)
51. Locci, R. (1989). Streptomyces and related genera. Bergey's manual of systematic bacteriology. Recuperado de <https://books.google.com.pe/books?id=66UMS7A2KisC&pg=PA511&dq=51.+Locci,+R.+1989.+Streptomyces+and+related+genera.+Bergey%27s+manual+of+systematic+bacteriology>
52. Lorenzoni, G. (2010). Poultry Diseases influenced by gastrointestinal health: traditional treatments and innovative solutions. Ed. Nottingham University Press. Recuperado de <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=R7axAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=52.%09Lorenzoni,+G.+2010.+Poultry+Diseases+influenced+by+gastrointestinal+health:+traditional+treatments+and+innovative+solutions>
53. Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2009). Brock biology of microorganisms. Recueperado de <https://www.worldcat.org/title/brock-biology-of-microorganisms/oclc/57001814>
54. Marck, N. (2002). Manual de producción avícola. México. Tercera edición. El Manual Moderno.
55. Márquez M., Martínez M., & Franco, M. (enero, 2003). Aislamiento de *Trichoderma* sp. y *actinomyces* a partir de suelos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y evaluación de su capacidad antagónica in vitro sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Revista

- Agronomía Colombiana. 19 (1), 81-88. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21883>
56. Masaquiza, D. (mayo 2012). Evaluación de cuatro atrapadores de micotoxinas (mycofix plus, mycofix select, aluminosilicatos, paredes de levaduras) en dietas para pollos parrilleros en crecimiento-engorde. (Tesis titulación, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo). Recuperada de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/1854>
57. Mera, L. (2018). Optimización de la extracción de proteína de Cañihua (*Chenopodium pallidicaule Aellen*) utilizando la metodología de superficie de respuesta. (tesis de titulación, Universidad Nacional Agraria la Molina). Recuperada de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3710>
58. Mercado, M., Ávila, J., Rey, M., Montoya, M., Gamboa, A., Carrascal, A. K., & Correa, D. X. (septiembre, 2012). Brotes por *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* asociados al consumo de pollo. *Biomédica*, 32(3). Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/843/84324092008.pdf>
59. Millán G., Pérez, M., Puentes Y., & Bocourt, R. (2007). Empleo de probióticos a base de *Bacillus* sp y sus endosporas en la producción avícola. *Rev. Cub. Ci. Agr.* 42(2), 117-122. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/896/89640734005.pdf>
60. Molina, D. (2018). Herramientas actuales para la modulación del ecosistema intestinal en aves comerciales. *Actualidad Avípecuaria* 5(2), 15-22.
61. Mohamed, H., Miloud, B., Zohra, F., García, J. M., Veloso, A., & Rodríguez-Couto, S. (july, 2017). Isolation and characterization of Actinobacteria from Algerian Sahara soils with antimicrobial activities. *International journal of molecular and cellular medicine* 6(2), 109-120. Doi: 10.22088/acadpub.BUMS.6.2.5

62. Moreno, P., Ramos, R., Villena, G., & Gutiérrez Correa, M. (2015). Microbiología: Guía de Laboratorio. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 28–33.
63. Murakami, H., Akiba, Y., & Horiguchi, M. (January, 1992). Growth and utilization of nutrients in newly-hatched chicks with or without removal of residual yolk. *Growth Dev. Aging* 56, 75–84. Recuperado de <https://europepmc.org/abstract/med/1517007>
64. Narváez, S., & Oñate, G. (2002). Perfil de Proyecto de Fortalecimiento de avicultura rural en Ecuador, Ministerio Agricultura y Ganadería del Ecuador. Quito. Ecuador.
65. Palomino Cauchos, D. C. (2015). Evaluación productiva y económica de gallinas criollas en postura en una crianza vivencial en el predio Hualaria, Alis–Yaayos. (tesis de titulación, Universidad Nacional del Centro del Perú). Recuperada de <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/UNCP/1849>
66. Pacheco, L. (2016). Determinación de la capacidad biofertilizante de actinomicetos en presencia de metales pesados. Maestro en Microbiología. (tesis de maestría, Universidad Peruana Cayetano Heredia). Recuperada de <http://repositorio.upch.edu.pe/handle/upch/467>
67. Pérez, F., León, J., & Galindo, N. (junio, 2015). Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum spp. andigena Hawkes*). *Revista mexicana de fitopatología*. 33(2), 116-139. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v33n2/2007-8080-rmfi-33-02-00116.pdf>
68. Piñero J., & Rivas, N. (octubre, 2004). Aislamiento y caracterización de una cepa de actinomiceto celulolítico, termófilo moderado y acidófilo. *Revista Científica* 14(5),412-418. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95914505>

69. Prescott, L.M. (2002). Microbiology. 5ta Ed. Boston, USA. Editorial Mc Graw Hill Company. Recuperado de [https://www.worldcat.org/title/microbiologia/oclc/796238580&referer=brief\\_results](https://www.worldcat.org/title/microbiologia/oclc/796238580&referer=brief_results)
70. Quiñones, E., Evangelista, Z., & Rincón, G. (marzo, 2016). Los Actinomicetos y su aplicación biotecnológica. Elementos 101,59-64. Recuperado de <http://www.elementos.buap.mx/num101/htm/59.htm>
71. Repo-Carrasco, R., Espinoza, C., & Jacobsen, S. (august, 2003). Nutritional value and use of the Andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kaniwa (*Chenopodium pallidicaule*). Food Reviews International (19),179-189. Doi: 10.1081/FRI-120018884
72. Reyes, M., Gómez-Sánchez, I., Espinoza, C., Bravo, F., & Ganoza, L. (2009). Tablas peruanas de composición de alimentos. Perú, Instituto Nacional de Salud. Recuperado de <http://www.rvcta.org/Imagenes/TablasPeruanasDeComposicionDeAlimentos.pdf>.
73. Rodríguez, J. R. (2010). Evaluación de Etapas del proceso productivo de un Bioinsumo dirigido a la degradación de materiales orgánicos y regulación sanitaria de cultivos. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10839/72>
74. Romo, S., Rosero, A., Forero, C. L., & Cerón, E. (marzo, 2006). Potencial nutricional de harinas de quinua (*Chenopodium quinoa* W.) variedad Piartal en los Andes Colombianos. Primera parte. Facultad de Ciencias agropecuarias. Universidad del Cauca 4(1), 112-125. Recuperado de <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/639>
75. Ronsón A., & Medina, C. (agosto, 2010). Probióticos en la acuicultura. Ciencia y Mar. 2(3), 45-49. Recuperado de <http://www.umar.mx/revistas/>
76. Rosende, S., & Juri, A. (junio, 1986). Exclusión competitiva de *Salmonella typhimurium* en pollitos de un día de edad por la flora bacteriana normal del ciego de

- aves adultas. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 1(1),26-29. Doi: 10.5354/0719-5273.2010.10379
77. Rosmini, M. R., Sequeira, G. J., Guerrero, L. I., Martí, L. E., Dalla S. R., Frizzo, L., & Bonazza, J. C. (2004). Producción de Prebióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 3(2),181-191. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/620/62030203.pdf>
78. Salamoni, S. P. (2005). Produção e caracterização de celulases secretadas por *Streptomyces* sp. isolado de processo de compostagem. (tesis de maestría, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul). Recuperado de <http://hdl.handle.net/10183/7411>
79. Salazar, A., & Ordoñez, C. (2013). Aislamiento e identificación de Actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. (tesis de licenciatura, Universidad Tecnológica de Pereira). Recuperada de <https://core.ac.uk/download/pdf/71397057.pdf>
80. Sarker, K., Ri-Parque, A., Kim, G., & Chul-Ju, Y. (2010). Alternativa a los antibióticos para la producción de pollos de engorde. *Diario de Plantas Medicinales de Investigación*. 4(5),415-420.
81. Sastoque-Cala, L., Mercado-Reyes, M., Martínez-Salgado, M. M., Quevedo-Hidalgo, B., & Pedroza-Rodríguez, A. M. (mayo, 2007). Producción de quitinasas extracelulares con una cepa alcalófila halotolerante de *Streptomyces* sp. aislada de residuos de camarón. *Revista mexicana de ingeniería química*. 6(2). Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/620/62060202.pdf>
82. Schwalbe, R., Steele-Moore, L., & Goodwin, A. C. (mayo, 2007). Antimicrobial susceptibility testing protocols. 53-72. Doi: 10.1201/9781420014495



83. Servicio Nacional De Meteorología E Hidrología. (SENAMHI) (2019). Recuperado de <https://senamhi.gob.pe/?p=pronostico-detalle&localidad=0033>.
84. Servicio Nacional De Sanidad Agraria. (SENASA). Procedimiento: recolección y envío de especímenes/muestras, y exámenes solicitados al laboratorio. 2008. Recuperado de <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2014/12/PRO-UCDSA-06-Recoleccion-y-envio-de-especimenes.pdf>.
85. Sialer, C. A. (2011). Aislamiento y caracterización de actinomicetos asociados a hormigas de la tribu Attini. (Tesis doctoral, Universidad de Oviedo). Recuperada de <http://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/12650>
86. Smith, H. W. (october, 1965). The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *Journal of Pathology and Bacteriology*. 90, 495-513. Doi: 10.1002/path.1700900218
87. Sumano López, H. S., & Gutiérrez, L. (2010). Farmacología clínica en aves comerciales. Recuperado de <https://es.scribd.com/doc/280539512/Sumano-Lopez-Hector-Farmacologia-Clinica-en-Aves-Comerciales>
88. Sylvia, D. M. 2005. Principles and applications of soil microbiology. 2 ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall. USA. Recuperado de [https://www.researchgate.net/profile/David\\_Zuberer/publication/265885976\\_Principles\\_and\\_Applications\\_of\\_Soil\\_Microbiology\\_Edited\\_by\\_links/588797774585150dde50350b/Principles-and-Applications-of-Soil-Microbiology-Edited-by.pdf](https://www.researchgate.net/profile/David_Zuberer/publication/265885976_Principles_and_Applications_of_Soil_Microbiology_Edited_by_links/588797774585150dde50350b/Principles-and-Applications-of-Soil-Microbiology-Edited-by.pdf)
89. Taddei, A., Rodríguez, M. J., Márquez E., & Castelli, C. (july, 2006). Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies. *I. Microbiological Research*. 161(3), 222-231. Doi: 10.1016/j.micres.2005.08.004

90. Tan, H., Deng, Z., & Cao, L. (july, 2009). Isolation and characterization of actinomycetes from healthy goat faeces. *Letters in applied microbiology*. 49(2), 248-253. Doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02649.x
91. Tate, R. I. (2000). *Soil Microbiology* (second ed.), Wiley, New York. Recuperado de <https://www.wiley.com/en-us/Soil+Microbiology%2C+2nd+Edition-p-9780471317913>
92. Tokala K., Strap, C., Jung, D., Crawford, L., Salove, L., Deobald, F., Bailey, J., & Morra, J. (january, 2002). Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2161-2171. Doi: 10.1128/AEM.68.5.2161-2171.2002
93. Ugarte, D. F. (2016). Evaluación de la capacidad lixivante de actinomicetos aislados de concentrados y relaves mineros en Perú. (tesis de maestría, Universidad Peruana Cayetano Heredia). Recuperada de <http://repositorio.upch.edu.pe/handle/upch/555>
94. Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., & Van Sinderen, D. (September, 2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71(3), 495-548. Doi: 10.1128/MMBR.00005-07
95. Villacís, G., Escudero, G., Cueva, F., & Luzuriaga, A. (diciembre, 2016). Características morfométricas de las gallinas criollas de comunidades rurales del sur del Ecuador. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 27(2), 218-224. Doi: 10.15381/rivep.v27i2.11639
96. Villanueva, C., Oliva, A., Torres, Á., Rosales, M., Moscoso, C., & González, E. (2015). Manual de producción y manejo de aves de patio. Serie técnica. Manual técnico. (148),64.recuperado de <http://www.siatma.org/sitios/biblioteca/uploads/00015-GRAF-SLM.pdf>

97. Wendisch, F.; Kutner, J. 1986. The family Streptomycetaceae. In Star PM, Stolp H, Truper GH, Balows A, Sclegel GH, editors. The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. 2 ed. New York: Springer Business Media. Recuperado de <https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=RpPuCAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&dq=The+prokaryotes.+A+handbook+on+habitats,+isolation+and+identification+of+bacteria>
98. Yegani, M., & Korver, D. R. (october, 2008). Factors affecting intestinal health in poultry. *Poultry science*. 87(10), 2052-2063. Doi: 10.3382/ps.2008-00091
99. Zotchev, S. B. (july, 2014). Genomics-based insights into the evolution of secondary metabolite biosynthesis in actinomycete bacteria. In *Evolutionary Biology: Genome Evolution, Speciation, Coevolution and Origin of Life*. Springer, Cham. Doi: 10.1007/978-3-319-07623-2\_2

## **VIII. ANEXOS**

## Anexo 1

### Características de las aves consideradas para el estudio

Ave	Propietario (P)	Edad	Etapas de manejo**
1	P1	> 24 semanas, < 80 semanas	Postura
2	P2	> 80 semanas	Descarte
3	P3	< 20 - 24 semanas	Levante
4	P3	> 24 semanas, < 80 semanas	Postura
5	P3	< 20 - 24 semanas	Levante
6	P2	> 24 semanas, < 80 semanas	Postura
7	P4	> 80 semanas	Descarte
8	P1	> 24 semanas, < 80 semanas	Postura
9	P1	> 24 semanas, < 80 semanas	Postura
10	P1	> 24 semanas, < 80 semanas	Postura

\* Todos los especímenes aviares fueron hembras.

\*\* Levante: Pollita con ausencia de o con reducido desarrollo folicular, en proceso de alcanzar la madurez sexual y entrar al período de postura; Postura: Gallina con madurez sexual alcanzada, se encuentra en el período de postura y muestra una jerarquía folicular ovárica definida; Descarte: Gallina adulta, con presencia de folículos en regresión o atrofiados. Postura mínima o cese total de postura.

## Anexo 2

### Proceso de necropsia y toma de muestra



a. gallina criolla. b. sacrificio del animal mediante la técnica de dislocación cervical. c. corte de la piel desde la entrada torácica hasta la cloaca con retiro de la piel del abdomen y pecho, y desarticulación de las articulaciones coxofemorales. d. extracción del tracto digestivo. e. apertura y revisión de la superficie del tracto digestivo. f. toma de muestra del contenido intestinal de cada porción del tracto digestivo.

### Anexo 3

#### Coloración de micelio de actinomicetos

Coloración de micelio aéreo
Amarillo
Blanco
Blanco con puntos negros y grises
Blanco gris
Blanco o crema con puntos blancos
Café
Café claro
Café con blanco
Café con puntos blancos
Café oscuro
Crema
Gris
Gris bordes blancos con puntos negros
Gris con bordes blancos
Gris oscuro
Gris plateado
Marrón y blanco
Morado
Naranja
Naranja claro
Naranja oscuro
Plateado
Plateado con blanco
Rojo
Rosado pálido
Rosado tenue
Verde
Verde con bordes verde claro
Verde oscuro
Vino tinto
Violeta

FUENTE: Adaptado de Franco (2008)

#### Anexo 4

### Coloración de micelio de actinomicetos

Coloración de micelio
Amarillo
Amarillo tenue
Blanco
Blanco rojizo
Blanco grisáceo
Blanquecino
Blanco marrón
Crema
Grisáceo
Beige rojo
Plomizo
Marrón tenue
Marrón claro
Marrón oscuro
Marrón verde
Marrón rojizo
Plomizo
Rosáceo
Morado

FUENTE: León *et al.*, 2011



## Anexo 5

### Composición y preparación de medios de cultivo

#### a. Caldo peptona

- Marca: Conda (500g), promotor de crecimiento de bacterias
- Preparación: suspender 20 gramos del medio en un litro de agua destilada, homogenizar y finalmente autoclavar durante 15 minutos a 120°C, pH 6.9 – 7.3

Composición	g/l
Pancreatic digesto of casein	10.00
Sodium chloride	5.00
Disodium phosphate	3.50
Monopotasium phosphate	1.50

**Fuente:** Manual de medios de cultivo Microbiológico Conda. 2015

#### b. Agar avena

- Promotor de crecimiento y esporulación de bacterias
- Preparación: suspender 60g de avena en un litro de agua destilada, homogenizar y finalmente autoclavar durante 15 minutos a 120°C, pH 7

Composición	g/l
Avena	60.0
Agar	15.0
Sacarosa	5.0

**Fuente:** Franco, 2008

### c. Mueller Hinton

- Marca: Difco (500g), para la determinación de la actividad antagónica de los actinomicetos.
- Preparación: disolver 38g por litro de agua destilada, pH 7,3 +/- 0,2.

<b>Composición</b>	<b>g/l</b>
Extracto de carne bovina	2,0
Hidrolizado ácido de caseína	17,5
Almidón	1,5

**Fuente:** Manual de medios de cultivo Microbiológico Conda, 2015

## Anexo 6

### Composición de medios de cultivo sólidos en base a quinua, kiwicha, cañihua y maíz

Medios de cultivo	Composición					
	Agar (15.0 g/l)	Sacarosa (5.0 g/l)	Quinua (60.0 g/l)	Kiwicha (60.0 g/l)	Cañihua (60.0 g/l)	Maíz (60.0 g/l)
Agar Quinua	✓	✓	✓			
Agar Kiwicha	✓	✓		✓		
Agar Cañihua	✓	✓			✓	
Agar Maíz	✓	✓				✓

Preparación: agregar los componentes a agua destilada, calentar al fuego durante 5 minutos.

Autoclavar a 15 lb y 121 °C. servir en placas petri estériles.

**Fuente:** Elaboración propia

## Anexo 7

### Características macroscópicas de actinomicetos aislados del tracto digestivo de gallinas criollas

Código	Textura	Color de micelio de sustrato	Color de micelio aéreo	Pigmento difusible	Coloración de pigmento difusible
P001	Pulverulenta	Marrón rojizo	Verde	Si	Rojo anaranjado
P002	Pulverulenta	Café claro	Marrón	Si	Amarillo marrón
P003	Pulverulenta	Verde	Verde	Si	Verde oscuro
P004	Pulverulenta	Verde	Verde	Si	Verde oscuro
P005	Pulverulenta	Café claro	Verde con bordes verde claro	Si	Amarillo marrón
P006	Pulverulenta	Café claro	Marrón verde	Si	Amarillo marrón
P007	Pulverulenta	Verde	Verde con bordes verde claro	Si	Amarillo marrón
P008	Pulverulenta	Verde	Marrón verde	Si	Verde oscuro
P009	Pulverulenta	Verde	Gris	Si	Verde oscuro
P010	Pulverulenta	Verde	Verde	Si	Verde oscuro
P011	Tizosa	Verde	Gris	Si	Verde oscuro
P012	Pulverulenta	Marrón rojizo	Gris	Si	Rojo anaranjado
P013	Pulverulenta	Verde	Gris	Si	Verde oscuro
P014	Pulverulenta	Blanco	Blanco	No	Sin color
P015	Pulverulenta	Café	Marrón	Si	Amarillo marrón
P016	Pulverulenta	Café claro	Marrón verde	Si	Verde oscuro
P017	Pulverulenta	Café claro	Verde	No	Sin color
P018	Pulverulenta	Café	Verde	Si	Amarillo marrón
P019	Pulverulenta	Café	Gris	Si	Amarillo marrón
P020	Pulverulenta	Verde	Verde	No	Sin color
P021	Pulverulenta	Café	Café	No	Sin color
P022	Pulverulenta	Verde	Verde con bordes verde claro	Si	Verde oscuro
P023	Pulverulenta	Verde	Verde	Si	Verde oscuro
P024	Tizosa	Verde	Gris	No	Sin color
P025	Tizosa	Verde	Gris	Si	Verde oscuro
P026	Aterciopelada	Rojo	Blanco	Si	Violeta
P027	Pulverulenta	Verde	Verde	Si	Verde oscuro
P028	Pulverulenta	Café claro	Gris con bordes blancos	No	Sin color
P029	Pulverulenta	Café claro	Naranja claro	No	Sin color
P030	Pulverulenta	Café claro	Gris con bordes blancos	Si	Amarillo marrón

Continuación...

P031	Pulverulenta	Marrón rojizo	Marrón verde	Si	Amarillo marrón
P032	Pulverulenta	Verde	Gris	No	Sin color
P033	Pulverulenta	Morado	Gris	Si	Violeta
P034	Tizosa	Naranja oscuro	Gris	Si	Amarillo marrón
P035	Pulverulenta	Café oscuro	Gris	Si	Amarillo marrón
P036	Aterciopelada	Rojo	Blanco	Si	Violeta
P037	Pulverulenta	Crema	Blanco	No	Sin color
P038	Pulverulenta	Café claro	Café	Si	Amarillo marrón
P039	Pulverulenta	Café claro	Rosado tenue	No	Sin color
P040	Pulverulenta	Crema	Blanco grisáceo	No	Sin color
P041	Seca	Verde	Verde con bordes verde claro	No	Sin color
P042	Seca	Café	Verde	No	Sin color

**Fuente:** Elaboración propia

## Anexo 8

### Pruebas bioquímicas realizadas a cepas de actinomicetos

CEPAS	Carbohidratos							
	Glucosa	Sacarosa	Lactosa	Fructosa	Xilosa	Arabinosa	Manosa	Maltosa
P001	+	+	+	+	+	+	+	+
P002		-	-	-	-			
P003	+	+	+	+	+	-	-	+
P004	+	+	+	-	+	+	-	+
P005	+	+	+	+	+	+	+	+
P006	-	-	-	-	-	-	-	-
P007	+	-	-	-	-	-	-	-
P008								
P009	-	+	+	+	+	+	+	-
P010	+	+	-	+	-	-	-	-
P011	+	+	+	-	+	+	+	+
P012	+	+	+	+	+	+	+	+
P013	-	+	+	-	+	-	-	+
P014	+	+	+	+	+	+	+	+
P015	+	+	+	-	+	+	+	+
P016	+	+	-	-	-	-	+	+
P017	+	+	+	-	+	-	+	+
P018	+	+	+	-	-	+	+	+
P019	-	-	-	-	-	-	-	-
P020	+	-	+	-	-	-	-	-
P021	-	-	-	-	-	-	-	-
P022	+	+	+	-	-	-	-	-
P023	-	-	-	-	-	-	-	-
P024	-	-	-	-	-	-	-	-
P025	-	+	+	-	+	+	-	-
P026	-	-	-	-	-	-	-	+
P027	+	+	+	+	+	+	-	-
P028	-	+	+	+	+	+	+	+
P029	+	+	+	+	+	+	+	+
P030	+	+	+	-	-	+	+	+
P031	-	-	-	-	-	-	-	-
P032	-	-	-	-	-	-	-	-
P033	-	+	-	+	-	-	+	+
P034	-	+	+	+	+	+	+	+
P035	+	+	-	+	+	+	+	-
P036	-	-	+	-	-	-	-	+
P037	-	-	-	-	-	-	-	-
P038	-	-	-	-	-	-	-	-
P039	+	+	+	+	+	+	+	+
P040	-	+	-	-	+	-	-	-
P041	-	-	-	-	-	-	-	-
P042	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Elaboración propia

## Anexo 9

### Principales hallazgos obtenidos durante las necropsias de las gallinas

Hallazgos de Necropsia	Número de Ave									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Empastamiento de cloaca y leve desviación de la quilla.	✓									
Moderado depósito de grasa subcutánea y abdominal, de intenso color amarillo, posiblemente relacionado al tipo de dieta.	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Hígado aparentemente normal con intensa coloración naranja posiblemente debido a la dieta.	✓								✓	✓
Contenido verduzco en molleja conformado por maíz, piedrecillas y verduras.	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Cutícula de molleja con presencia de dos pequeñas ulceraciones en el borde distal.	✓	✓								
Contenido verde pastoso en intestinos con presencia de nemátodos en yeyuno, íleon y ciegos; y presencia de céstodos (tenias) en yeyuno e íleon.	✓		✓	✓		✓	✓		✓	
Jerarquía folicular a nivel del oviducto bien definida.	✓			✓		✓		✓		
Hígado con dos focos necróticos en el lóbulo hepático derecho posiblemente relacionado con un cuadro infeccioso bacteriano.		✓								
Mucosa intestinal con leve a moderado engrosamiento		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Contenido acuoso de color amarillento a verduzco a lo largo del intestino.		✓								
Atrofia folicular aparentemente relacionada con la edad		✓								✓
Tracto reproductivo inmaduro, sin presencia de jerarquía folicular.			✓		✓					
Contenido intestinal de consistencia acuosa verduzca en las diferentes porciones intestinales					✓			✓		
Folículos en proceso de regresión posiblemente asociado a la edad.									✓	
Escaso contenido en el lumen a lo largo de los intestinos, en la porción del íleon poco contenido pastoso de color verde. No se evidenció presencia de parásitos										✓

**Fuente:** Elaboración propia

## Anexo 10

### Crecimiento y esporulación de cepas de actinomicetos aislados de gallinas criollas

Código	Quinua		Kiwicha		Maíz		Cañihua	
	Crecimiento	Esporulación	Crecimiento	Esporulación	Crecimiento	Esporulación	Crecimiento	Esporulación
P001	✓	++	✓	+++	✓	+	✓	++
P002	✓	++	✓	+++	✓	+	✓	++
P003	✓	+	✓	+++	✓	+	✓	++
P004	✓	+	✓	++	✓	+	✓	++
P005	✓	++	✓	+++	✓	+	✓	+
P006	✓	+	✓	+++	✓	+	✓	+
P007	✓	++	✓	++	✓	+	✓	+
P008	✓	+	✓	++	✓	+	✓	-
P009	✓	+	✓	+++	✓	++	✓	++
P010	✓	+	✓	+++	✓	++	✓	++
P011	✓	+	✓	++	✓	++	✓	++
P012	✓	++	✓	+++	✓	++	✓	++
P013	✓	-	✓	++	✓	++	✓	++
P014	✓	-	✓	-	✓	++	✓	++
P015	✓	+	✓	++	✓	++	✓	++
P016	✓	++	No	-	✓	++	✓	++
P017	✓	++	✓	+++	✓	++	✓	+++
P018	✓	++	✓	+++	✓	++	✓	++
P019	No	-	No	-	No	-	✓	++
P020	✓	-	✓	+++	✓	++	No	-
P021	✓	+	✓	-	✓	+	✓	++
P022	✓	-	No	-	✓	++	✓	+
P023	No	-	✓	-	✓	-	No	+
P024	No	-	✓	+++	No	-	No	-
P025	✓	-	✓	++	✓	++	No	-
P026	✓	+	✓	++	✓	+	✓	-
P027	✓	+	✓	+++	✓	++	✓	++
P028	✓	++	✓	++	✓	+	✓	++
P029	✓	+	✓	++	✓	+	✓	+
P030	✓	+	✓	+++	✓	++	✓	+
P031	✓	+	✓	++	✓	-	✓	+
P032	✓	++	✓	++	✓	++	✓	+++
P033	✓	++	✓	+	✓	+	✓	+++
P034	✓	++	✓	+	✓	+	✓	+++
P035	✓	++	✓	+	✓	+	✓	+++
P036	✓	++	✓	++	✓	+	✓	++
P037	✓	+	✓	++	✓	+	✓	++
P038	✓	+	✓	+	✓	+	✓	+
P039	✓	++	✓	++	✓	+	✓	+
P040	✓	+	✓	+	✓	+	✓	+
P041	✓	+	✓	+	✓	+	✓	+
P042	✓	+	✓	+	✓	+	✓	+

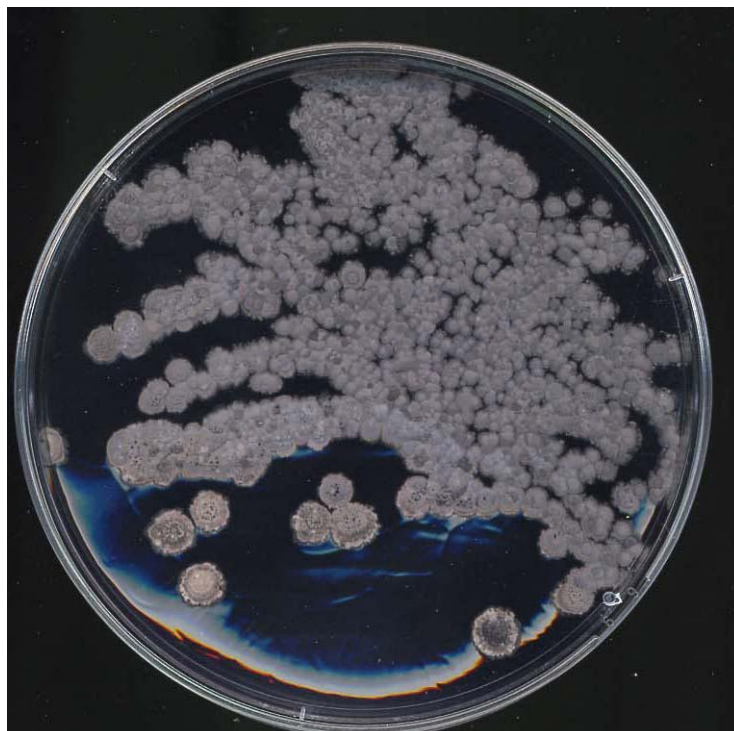
\*✓/: con crecimiento, No: sin crecimiento, +++: abundante, ++: moderado, +: escaso, -: sin esporulación

Fuente: Elaboración propia



## Anexo 11

### Cepa control CS080 *Streptomyces lividans*



Fuente: Sialer (2011)

Característica	Descripción
Color de micelio aéreo	Gris
Color de micelio de sustrato	Gris
Presencia de pigmento difusible	Si
Coloración de pigmento difusible	Azul
Fuente de carbono	Arabinosa-Fructosa-Glucosa-Manitol-Sacarosa-Xilosa
Efecto antagónico (Bacterisostático)	<i>Listeria monocytogenes</i> – <i>Staphylococcus aureus</i>

Fuente: Sialer (2011)