

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Excelencia que trasciende

**Disminución de la carga microbiana en
camas de pollos de engorde utilizando 3
desinfectantes**

Gilda Margarita Alonzo Argueta

Guatemala
2006

**Disminución de la carga microbiana en
camas de pollos de engorde utilizando 3
desinfectantes**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

**Disminución de la carga microbiana en
camas de pollos de engorde utilizando 3
desinfectantes**

Trabajo de Graduación presentado por Gilda Margarita Alonzo
Argueta para optar al grado de Licenciada en Bioquímica y
Microbiología.

Guatemala
2006

PREFACIO

En Guatemala, la mayoría de las granjas rurales de pollos de engorde no cuentan con las normas mínimas de bioseguridad, tanto para los animales como para el personal de las mismas y pueden convertirse en focos de contaminación para las poblaciones cercanas. La expansión por el mundo de enfermedades transmitidas por las aves, como la gripe aviar, nos coloca en una situación de alerta pero sobre todo, de control y prevención.

Las camas de pollos de engorde generalmente no se reutilizan debido a la contaminación que dejan en ellas los lotes de pollos anteriores y éstas terminan desechándose al ambiente sin ningún tratamiento previo. Muchas granjas quedan en las riveras de los ríos por lo que la contaminación de las camas puede ser esparcida por toda una comunidad. Dicha contaminación no solamente puede ser por el agua sino mediante el aire, insectos u otros factores que interaccionen con las camas y contaminadas que son desechados.

Otro problema importante a considerar es el uso de algunos desinfectantes que, si bien reducen la carga microbiológica, generan daños permanentes e irreversibles al medio ambiente, como es el caso del cloro, el desinfectante más utilizado y uno de los más perjudiciales. En este estudio por tanto, se pretendió evaluar la capacidad antimicrobiana de tres desinfectantes que son biodegradables, así como determinar la concentración adecuada para aplicarlos sin perjudicar a las aves, al personal de la granja o a las comunidades cercanas y brindar así una herramienta útil para los avicultores en los procesos de desinfección de las camas de los pollos de engorde, y la reutilización segura de las mismas.

Agradezco la colaboración de todas las personas que contribuyeron para que este estudio se realizara: al Dr. Eduardo Santos y al Ing. Edgar Pérez, de la empresa Bayer®,

al Sr. Alvaro Molina, propietario de la granja en donde realizamos los estudios, al Dr. Héctor Aguilar, director del departamento de Bioquímica y Microbiología y al Lic. Osbel Núñez por su orientación y supervisión durante el proyecto. A mis padres, Marco Aurelio Alonzo y Elizabeth Argueta de Alonzo, por su apoyo incondicional. A mi hermano Marco Antonio, quien ha sido mi apoyo en todo momento y además colaboró en el trabajo de campo. A mi asesor, el Lic. Marco Tulio Urizar, mil gracias por permitirme tener la experiencia de aprender a poner en práctica todos los conocimientos teóricos que aprendí a lo largo de la carrera, gracias por su guía y por su apoyo al permitirme desarrollar este proyecto.

Agradezco a mis amigos, catedráticos y compañeros de la Universidad del Valle de Guatemala, quienes en todo momento estuvieron a mi lado para apoyarme cuando lo necesité. Especialmente a Ana Lucía, que me apoyó y orientó desinteresadamente a lo largo de la carrera, y siempre me dio los consejos necesarios, a Marina, mi compañera de laboratorios, clases y actividades, a Rose mi gran amiga, a Bobby y el chino, que siempre estuvieron para mí. A profesores como el Dr. Roberto Molina, el Lic. José Carlos Chiquín, o el Lic. Dorval Carías en cuyas clases aprendí y disfruté con el verdadero estilo de la del Valle.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS	viii
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
A. ANTECEDENTES	2
1. Manejo de camas	3
2. Medidas higiénicas	4
3. Control de plagas	4
4. Sanidad Animal	4
5. Alimentación y agua	5
6. Situación ambiental	7
7. Biodiversidad	7
8. Impacto territorial	7
9. Bacterias coliformes	7
a. Género <i>Escherichia</i>	8
b. Cultivo de bacterias	9
c. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación	14
10. Desinfectantes	15
a. Toxicología de desinfectantes y derivados del desinfectante	17
b. Cloro	17
c. Ácido peracético	18
B. JUSTIFICACIÓN	19
C. OBJETIVOS	20
D. HIPÓTESIS	21
II. MATERIALES Y MÉTODOS	22
A. Materiales a utilizar	22
B. Procedimientos	24
C. Cronograma	27
III. RESULTADOS	28
IV. DISCUSIÓN	31
V. CONCLUSIONES	34

VI. RECOMENDACIONES	35
VII. BIBLIOGRAFÍA	36
VIII. APÉNDICES	
A. Glosario	39
B. Normas COGUANOR	40
C. Medios de cultivo	44
D. Desinfectantes a utilizar	47
E. Análisis de varianza de los resultados	49
F. Otros análisis	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.	Página
1. Conteo total de colonias y NMP/100mL del agua de la granja	28
2. Conteo total de colonias, NMP/100mL en la cama de pollo de engorde antes de aplicar los tratamientos.	28
3. Conteo de colonias a 25°C en camas de pollos después de 1 y 2 semanas de tratamiento	29
4. Conteo de colonias a 37 °C en camas de pollos después de 1 y 2 semanas de tratamiento	29
5. NMP/100mL de coniformes totales después de 1 y 2 semanas de aplicado el tratamiento	29
6. NMP/100mL de <i>E. coli</i> después de 1 y 2 semanas de aplicado el tratamiento	30
7. Prueba F de los conteos totales y NMP	30
8. Necesidades nutricionales mínimas de bacterias heterótrofas	44
9. Método tradicional de NMP	44
10. NMP para 3 tubos con 0.1, 0.01 y 0.001mL	45
11. Método de Fluorocult®	46
12. Método de aplicación de Virkon®	48
13. ANOVA para conteo total a 25°C semana 1	49
14. Continuación ANOVA para conteo total a 25°C semana 1	49
15. ANOVA para conteo total a 25°C semana 2	50
16. Continuación ANOVA para conteo total a 25°C semana 2	50

17. ANOVA para conteo total a 37°C semana 1	50
18. Continuación ANOVA para conteo total a 37°C semana 1	50
19. ANOVA para conteo total a 37°C semana 2	51
20. Continuación ANOVA para conteo total a 37°C semana 2	51
21. ANOVA de NMP/100mL de coliformes totales semana 1	51
22. Continuación de ANOVA de NMP/100mL de coliformes totales en semana 1	51
23. ANOVA de NMP/100mL de coliformes totales semana 2	52
24. Continuación de ANOVA de NMP/100mL de coliformes totales en semana 2	52
25. ANOVA de NMP/100mL de <i>E. coli</i> en semana 1	52
26. Continuación ANOVA de NMP/100mL de <i>E. coli</i> semana 1	52
27. ANOVA de NMP/100mL de <i>E. coli</i> en semana 2	53
28. Continuación ANOVA de NMP/100mL de <i>E. coli</i> semana 2	53
29. Conteo total de colonias, NMP/100mL en el aserrín comercial antes de usarse como cama de pollo de engorde.	53

RESUMEN

Se realizó una comparación entre el efecto sobre la carga microbiológica en camas de pollos de engorde utilizando como desinfectantes ácido peracético (Hyperox®), ácido peracético mas ácidos orgánicos (Virkon®) y Farm Fluid® en las concentraciones de 1:100, 1:500 y 1:1000 para cada desinfectante, aplicando a razón de 1 litro por metro cuadrado de cama de pollo.

Después de 1 y 2 semanas de aplicados los tratamientos, se comprobó que no existe diferencia estadísticamente significativa en el conteo total, NMP/100mL de coliformes totales y *Escherichia coli* entre los distintos tratamientos utilizados por lo que se recomienda repetir el estudio agregando 2 y 3 litros de tratamiento por metro cuadrado.

I. INTRODUCCIÓN

La industria avícola se encuentra expuesta a una gran variedad de riesgos debidos, en gran parte, por microorganismos patógenos existentes en el ambiente y que pueden diseminarse con facilidad en las granjas de pollos de engorde, produciendo grandes pérdidas de animales y afectando seriamente la economía de los productores.

La prevención es la mejor medida que puede tomarse contra la mayoría de enfermedades infecciosas y es ahí en donde radica la importancia que las granjas de pollos cuenten con un sistema adecuado de limpieza y desinfección, basado en las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), procurando que, a la vez que se minimice la presencia de patógenos, que los productos utilizados no formen derivados que afecten al ambiente o que por su acción tóxica pongan en riesgo la salud de los animales o del humano (Comisión Nacional de Buenas Prácticas Agrícolas).

Los pollos de engorde pasan su vida en galeras que utilizan en el suelo una “cama”, generalmente de aserrín. Debido a sus componentes la “cama” posee el ambiente propicio para el crecimiento de bacterias, hongos, parásitos y además que almacena desechos de las aves. El cloro es el desinfectante más comúnmente utilizado, sin embargo causa efectos nocivos al ambiente y a la salud humana se sugiere utilizar nuevos productos a base de ácido peracético, que son biodegradables y sin comprometer su efecto microbicida. (World Health Organization 2000).

Con este trabajo, se pretendió establecer el efecto antimicrobiano sobre la cama de pollos de engorde, del ácido peracético (Hyperox®), ácido peracético más ácidos orgánicos (Virkon®), y Farm Fluid®, en tres diluciones en una granja de pollos de engorde del departamento de Alta Verapaz.

A. Antecedentes

Las granjas avícolas deben estar aisladas y evitar proximidades con otras instalaciones de producción, tanto de animales como de sistemas industriales. Además, deben considerar el impacto ambiental en su ubicación, tener un sistema funcional de drenajes y estar sujetas a las legislaciones vigentes en cada país. Los caminos de acceso deben facilitar el transporte de los trabajadores y proveedores hacia las unidades productivas (Comisión Nacional de Buenas Prácticas Agrícolas).

Para la bioseguridad debe tenerse un procedimiento operacional estandarizado, POE, que regule el ingreso de personas, animales y vehículos a las avícolas. En el caso de los objetos personales de los trabajadores únicamente podrán ingresar a las unidades productivas si han sido completamente sanitizados. Todas las medidas adoptadas de bioseguridad deben tener la señalización adecuada para ser vista tanto por el personal como por los visitantes (Comisión Nacional de Buenas Prácticas Agrícolas)

En las granjas productoras de pollos de engorde las unidades productivas, pabellones e incubadoras, deben ser construidas para facilitar su limpieza y además cuidar que puedan proveer la luz y temperatura adecuadas para las aves, la humedad debe minimizarse porque las camas deben mantenerse lo más secas posibles y por tanto deben tener una buena ventilación y sin goteras (Comisión Nacional de Buenas Prácticas Agrícolas).

Se debe diseñar las instalaciones para proveer del espacio suficiente a las aves y permitir su comodidad y salud, así como protegerlas de las condiciones ambientales extremas, como ruidos y posibles depredadores. Es de especial atención tener las instalaciones eléctricas en buen estado y lo suficientemente aisladas para evitar riesgos de incendios u otros posibles accidentes. Si se cuentan con varios niveles de jaulas debe

vigilarse que los excrementos de los niveles superiores no afecten a los inferiores (López 1991).

1. Manejo de camas. Se deben efectuar todos los trabajos de reparación, mantenimiento y procedimientos adicionales de limpieza y sanitización, antes de ingresar cama nueva al pabellón. La cama nueva debe estar limpia y debe ser obtenida de un proveedor confiable para prevenir la contaminación con desechos biológicos o químicos. Es importante controlar la humedad de la cama de las aves controlando la circulación del aire en las galeras y sobre la superficie de la cama (Pérez 1994).

a. **Materiales de la cama.** Cuando las instalaciones estén limpias y desinfectadas se ingresa el material de la cama, que generalmente está formado por viruta de madera, cáscara de arroz, cáscara de soya o tamo de cebada, dependiendo de la disponibilidad del material en la zona en donde esté ubicada la granja. (CEBA 2006).

Se prepara la cama generalmente utilizando de 5 a 10cm de espesor. Mientras más delgada sea la cama se facilita la producción de gallinaza y la remoción de la misma (CEBA 2006).

Una vez preparadas las camas se asperzan con productos bactericidas y funguicidas, generalmente yodados (CEBA 2006).

Para reutilizar las camas en otro lote de pollos deberá primero verificarse que el lote anterior haya sido sanitariamente normal. Al realizar las labores de desinfección debe cuidarse de no humedecer en exceso el material de las camas para evitar el crecimiento de microorganismos. No se recomienda reutilizar la parte de la cama en donde se recibe al pollito recién nacido (Sánchez 1986).

2. Medidas higiénicas. Se deben implementar Procedimientos Operacionales Estandarizados de higiene y sanitización de las instalaciones y equipos (POES). Éstos deben considerar métodos de limpieza, agentes de limpieza, desinfectantes, períodos de aplicación, frecuencia de aplicación y responsables de la aplicación, entre otros. Todas aquellas personas en posiciones de responsabilidad deben encontrarse familiarizados con este procedimiento. Solo se podrá utilizar aquellos agentes desinfectantes o sanitizantes registrados y autorizados ante la autoridad pertinente (Sánchez 1986).

3. Control de plagas. Se debe establecer un procedimiento donde se especifiquen medidas pasivas y activas para el control de plagas. Se deben usar sólo plaguicidas cuyo registro esté aprobado por la autoridad competente. Para evitar el surgimiento de condiciones que favorezcan la aparición de plagas y enfermedades, las instalaciones y su entorno deben permanecer libres de basuras y desperdicios. Mantener la vegetación rasada en el perímetro de cada unidad productiva. En caso de usar roce con fuego, se debe contar con la autorización correspondiente (Pérez 1994).

4. Sanidad animal. El plantel debe contar con asistencia técnica veterinaria periódica que permita tener una cuidadosa observación del surgimiento de enfermedades y tratamiento de las mismas. Cada granja debe contar con un registro que de cuenta de las visitas efectuadas por el médico veterinario (Sánchez 1986).

Se debe realizar un monitoreo permanente y un programa de control y erradicación de las principales enfermedades exóticas como son influenza aviar, tifosis aviar (*Salmonella gallinarum*), ornitosis, infección por virus de Newcastle velogénico y viscerotrópico, así como de coccidios y de enfermedades prevalentes de notificación obligatoria, como pullorosis (*Salmonella pullorum*), *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma meleagridis* (pavos), cólera aviar, enfermedad de Gumboro, laringotraqueitis infecciosa, bronquitis infecciosa aviar, enfermedad de Marek, salmonelosis producida por *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, *Salmonella arizonae*, hepatitis A, cuerpos de inclusión (con lesiones) y tuberculosis, en concordancia con las

directrices establecidas por el Servicio Agrícola y Ganadero (Comisión Nacional de Buenas Prácticas Agrícolas, Urizar 1978).

Se debe establecer una relación efectiva entre el médico veterinario, el productor y los animales de la planta. Los médicos veterinarios asumen la responsabilidad de la decisión de realizar el tratamiento de los animales según los antecedentes de diagnóstico, y el productor o encargado está de acuerdo en seguir las instrucciones del médico veterinario. El médico veterinario tiene suficiente conocimiento de la situación de los animales, como para realizar un diagnóstico general o preliminar. El médico veterinario tiene la disponibilidad para seguir el caso y atender los animales si presentan reacciones adversas o fracasa el régimen de terapia recomendado (López 1991).

Las aves enfermas y/o tratadas deben ser registradas y controladas. Cada vez que se presenten evidencias y signos clínicos de enfermedad inexplicables o exista mortalidad de etiología desconocida se deben realizar necropsias, cultivos microbiológicos, pruebas serológicas y/o diagnósticos histopatológicos de las aves dependiendo de las indicaciones del médico veterinario. La prescripción de fármacos debe ser solamente generadas a partir del médico veterinario (Comisión Nacional de Buenas Prácticas Agrícolas).

Las compras de animales y material genético deben ser acompañado por certificados que declaren su estatus sanitario y que cumplan con las buenas prácticas avícolas. En el caso de animales y material genético importado se debe cumplir con la legislación nacional vigente la cual considera períodos de cuarentena y otros controles determinados por el Servicio Agrícola y Ganadero (Sánchez 1986).

5. Alimentación y agua.

a. Suministro de alimento. Se debe proporcionar a las aves dietas y esquemas de alimentación que aseguren el adecuado consumo de nutrientes, dependiendo de su edad y condición productiva, contribuyendo a su salud y bienestar (López 1991).

Cuando se proporcionen alimentos restringidos, se debe garantizar la oportunidad de que todas las aves tengan acceso a estos, proporcionando un adecuado espacio de comedero/ave. En el caso de los pollitos de un día, hay que tener especial cuidado de proporcionar una adecuada iluminación para que encuentren el alimento y agua (Comisión Nacional de Buenas Prácticas Agrícolas).

b. Calidad de los alimentos. El alimento a ser empleado, sea éste preparado por el mismo productor o adquirido a un proveedor externo, debe ser elaborado conforme con el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura para plantas de alimentos. Los alimentos destinados a diferentes usos deben estar claramente identificados y separados y deben contener sólo medicamentos y aditivos permitidos por el Servicio Agrícola y Ganadero (López 1991).

Todos los alimentos terminados deben ser transportados y almacenados en un lugar adecuado y bajo condiciones que aseguren su calidad físicoquímica y microbiológica (Comisión Nacional de Buenas Prácticas Agrícolas).

c. Suministro del agua de bebida. Debe existir un suministro continuo y suficiente de agua de bebida. Garantizando que todas las aves logren suplir sus necesidades de agua/día (Sánchez 1986).

d. Calidad del agua de bebida. Al comenzar un programa de Buenas Prácticas se debe hacer un análisis de riesgo del agua de bebida. Según los resultados obtenidos, se deben hacer los análisis correspondientes en un laboratorio acreditado, y repetirlos una vez al año, de acuerdo a los resultados del primer análisis y luego de haber tomado las medidas correctivas correspondientes (Ver apéndice B: NORMAS COGUANOR).

e. Bebederos. Se debe considerar en el programa de higiene y sanitización de la granja, una frecuencia permanente de limpieza de cada bebedero para mantener un suministro de agua inocua para el ave (Pérez 1994).

6. Situación ambiental. Los principales problemas ambientales que generan los planteles de producción de aves de carne, son la generación de residuos sólidos (guano, huevos de desecho y aves muertas), emisiones atmosféricas contaminantes (olores, amoníaco, polvo, etc.) y residuos líquidos (agua de desecho de los bebederos, de la desinfección de vehículos, y de los procesos de limpieza (Sánchez 1986).

7. Biodiversidad. Debe prohibirse la destrucción y la perturbación de áreas de protección de fauna, vegetación y otras comunidades, de la misma manera sus hábitat naturales, en especial al considerar un plan de control de vectores de plagas (Comisión Nacional de Buenas Prácticas Agrícolas).

8. Impacto territorial. Los propietarios de las plantas de industriales deben estar obligados a proteger el patrimonio cultural y natural de las zonas de influencia de las actividades productivas (Comisión Nacional de Buenas Prácticas Agrícolas).

La microbiología del ambiente tomó importancia al volverse de interés general la conservación y calidad del ambiente así como el conocer que los microorganismos desempeñan un papel principal en la transformación de los desechos humanos e industriales en sustancias reutilizables. Pueden encontrarse microorganismos en casi cualquier parte, se transportan por las corrientes de aire de la superficie de la tierra a las partes más altas de la atmósfera. Abundan en el suelo fértil y son transportados por el agua que fluye en la tierra, incluyendo los desechos humanos y pueden llegar a corrientes de agua y llevar consigo enfermedades. Sus condiciones de supervivencia son similares a las de las personas por lo que se encuentran en abundancia en el ambiente humano (Pélczar, Reid & Chan 1982).

9. Bacterias coliformes. Los organismos coliformes se analizan como señalizadores de la eficacia de un tratamiento y la integridad del sistema de distribución, mientras que los organismos coliformes termotolerantes, como la *Escherichia coli*, se analizan como indicadores de polución fecal (Rheinheimer 1987).

Las exigencias a las que debe responder un microorganismo indicador son: deben ser más resistentes que los patógenos a los agentes desinfectantes y por otra parte, ser incapaces de reproducirse o crecer en el ambiente acuático (Rheinheimer 1987).

Un buen indicador debe ser fácilmente aislable, identificable y enumerable en el menor tiempo posible y con el menor coste. Debe ser capaz de crecer en los medios de cultivo empleados, estar distribuido al azar en las muestras y ser resistente a la inhibición de su crecimiento por otras especies (Heizmann *et al* 1988).

a. Género: *Escherichia*. Son bacilos gram negativos que poseen lipopolisacáridos complejos en su pared celular y en ocasiones causan problemas a los animales y al hombre, existiendo además, cepas patógenas de alta virulencia. Se agrupan en colonias redondas, convexas y lisas con bordes definidos. Son aerobias (Alcama 2001).

Se detectan por tinción de Gram, son bacilos móviles, son esporulados. Producen ácido y gas a partir de glucosa, lactosa y manitol. Producen indol en caldo con triptófano y es positiva a la coloración con rojo de metilo (Gini 1995).

1) *Escherichia coli*. La importancia de *Escherichia coli* verocitotoxigénicos (VTEC) como agentes causales de infecciones alimentarias está aumentando en el mundo en general y en Europa en particular. Entre los VTEC, el serotipo más frecuentemente implicado es el O157H7 (Levine 1985).

VTEC causa diarrea que puede cursar con heces sanguinolentas, y es considerada como la causa más importante de la colitis hemorrágica en los humanos. Esta enfermedad puede agravarse hasta la aparición de un síndrome urémico hemolítico que puede comprometer la vida de paciente y que tiene una tasa de mortalidad entre el 5 y el 10% (Levine 1985).

La patogenicidad de las cepas de VTEC parece estar asociada con varios factores de virulencia, incluyendo las toxinas “Shiga-like” y de varias citotoxinas (Alcamo 2001).

b. Cultivo de bacterias.

1) Nutrición bacteriana. Todo organismo vivo necesita una fuente de energía, y obtener carbono de alguna manera, por lo general en forma de azúcar o como otros carbohidratos, nitrógeno, azufre y fósforo (Pélczar, Reid & Chan 1982).

Es posible dividir las bacterias en grupos tomando como base sus requerimientos nutricionales. En términos de la complejidad química de las sustancias nutritivas que se necesitan para el crecimiento, los autótrofos son los que tienen las necesidades más simples (Pélczar, Reid y Chan 1982).

Las bacterias heterótrofas se han estudiado más ampliamente que las autótrofas ya que están más relacionadas con el hombre, principalmente porque a este grupo pertenecen las que producen enfermedad. Este grupo de bacterias varía considerablemente en cuanto a sus necesidades de nutrientes para el desarrollo, ya que todas necesitan del carbono orgánico pero en distintos tipos de compuestos orgánicos para que puedan asimilarlos, además todas utilizan el CO₂ pero no como fuente única de carbono (Pélczar, Reid & Chan 1982). Por otro lado, una gran cantidad necesitan nitrógeno mediante compuestos nitrogenados. Algunas se satisfacen con el nitrógeno atmosférico, otras lo hacen con compuestos nitrogenados inorgánicos y otras más necesitan de uno o más compuestos orgánicos nitrogenados. Algunas bacterias heterótrofas prosperan en medios que no contienen vitaminas y otras necesitan vitaminas o sustancias similares a éstas (Pélczar Reid y Chan 1982). Como se indica en la tabla 2 del apéndice C, las bacterias pueden tener necesidades nutricionales simples o muy complicadas, dependiendo de la especie que se trate.

Algunos heterótrofos no crecen bien o no se desarrollan en el caldo nutritivo y requieren de un medio con preparación más compleja (Pélczar, Reid y Chan 1982).

A continuación se detallan los medios de cultivo clasificados de acuerdo a su función y aplicación:

2) Medios enriquecidos. La adición de componentes como sangre, sueros o extractos de tejidos animales y plantas al agar les proporciona sustancias nutritivas que complementan el medio para que favorezca el crecimiento de heterótrofos con necesidades nutricionales especiales (Pélczar, Reid y Chan 1982).

3) Medios selectivos. La adición de ciertas sustancias químicas específicas en el agar nutritivo inhibe el desarrollo de un grupo de bacterias sin alterar el crecimiento de otros grupos. En principio, se puede seleccionar las bacterias que sólo se desarrollen en presencia de compuestos orgánicos poco comunes agregando dichos compuestos al medio de cultivo y omitiendo todos los demás compuestos de carbono (Pélczar, Reid y Chan 1982).

4) Medios diferenciales. La adición de ciertos reactivos o sustancias químicas a los medios de cultivo trae como resultado determinado tipo de crecimiento bacteriano o de cambios, después de la siembra e incubación del medio, lo cual permite al observador diferenciar distintos tipos de bacterias (Pélczar, Reid y Chan 1982).

5) Medios de prueba. Para el ensayo de vitaminas, aminoácidos y antibióticos con microorganismos específicos, se utilizan medios de cultivo de composición conocida. Además se utilizan medios con composiciones especiales para probar los desinfectantes (Pélczar, Reid y Chan 1982).

6) Medios para conteo de bacterias. Para determinar el contenido bacteriano de sustancias, como leche y agua, se emplean ciertos tipos específicos de medios de cultivo. Se debe señalar su fórmula y las especificaciones dadas por el fabricante (Pélczar, Reid & Chan 1982).

7) Medios para caracterizar bacterias. Para determinar el tipo de crecimiento producido por los organismos, así como la capacidad de las bacterias para producir cambios químicos, se utiliza una amplia variedad de medios de cultivo (Pélczar, Reid & Chan 1982).

8) Medios de mantenimiento. Para preservar satisfactoriamente las características fisiológicas y la viabilidad de un cultivo a veces se requiere de un medio diferente de aquellos que son óptimos para el crecimiento. El crecimiento rápido y prolífico suele ocasionar la muerte rápida de las células. Por ejemplo, la adición de glucosa a un medio de cultivo, con frecuencia aumenta el crecimiento y probablemente se produce ácido por tanto, en un medio de mantenimiento es preferible suprimir la glucosa (Pélczar, Reid & Chan 1982).

«En relación con su estado físico se pueden establecer diferencias más amplias entre los medios, se emplean normalmente medios sólidos como rebanadas de papa para cultivos especiales de bacterias. Medios sólidos – reversibles o líquidos como el agar nutritivo. Los medios semisólidos contienen pequeñas cantidades de agar para darle consistencia» (Pélczar, Reid y Chan 1982).

Para el cultivo de bacterias se recurre a algunas sustancias naturales comunes. Los materiales en su forma natural no presentan ningún problema para tomarlos como medio de cultivo ya que simplemente se depositan dentro de los envases adecuados los cuales deberán esterilizarse antes de usarlos (Pélczar, Reid y Chan 1982).

Los medios que se preparan tipo agar o caldo nutritivos, se hacen mezclando los ingredientes individuales necesarios, o agregando agua a productos deshidratados que contienen todos los ingredientes. En el comercio se puede encontrar prácticamente todos los medios de cultivo en forma deshidratada (Alcama 2001).

La preparación de los medios de cultivo debe llevar los siguientes pasos:

- Cada ingrediente, o el medio deshidratado completo, se debe disolver en un volumen adecuado de agua destilada.
- Se determinará el pH del medio y si es necesario se ajustará. El pH se determina por medio de indicadores o potenciómetros.
- El medio se pondrá en recipientes adecuados, cuyas bocas se cierran con tapones de algodón, plástico o cubiertas de metal.
- Los medios se esterilizan generalmente en autoclaves (Pélczar, Reid y Chan 1982).

Además de conocer los nutrientes apropiados para el cultivo de bacterias, también conviene conocer las condiciones físicas del medio en donde el microorganismo pueda desarrollarse mejor. Así como las bacterias varían ampliamente en relación a sus necesidades nutricionales, también muestran respuestas diversas a las condiciones físicas del medio (Pélczar, Reid y Chan 1982).

9) Temperatura. Dado que el desarrollo de las bacterias depende de reacciones químicas y la velocidad con la que se efectúan es influenciada por la temperatura, el desarrollo bacteriano puede ser condicionado por la misma. Las variaciones de temperatura también pueden influir en los procesos metabólicos y la morfología celular (Pélczar, Reid y Chan 1982).

Cada especie de bacterias crece a temperaturas que están en ciertos límites. Por tanto, pueden clasificarse en los siguientes grupos:

- Psicófilas: pueden desarrollarse a 0°C o menos, aunque crecen mejor a temperaturas cercanas a 15° y 20°C.
- Mesófilas: crecen mejor en límites de temperatura entre los 25° y 40°C.
- Termófilas: crecen mejor entre 45° y 60°C. Algunas se extienden a la región mesofílica se les conoce como termófilas facultativas o euritermófilas. Otras especies crecen mejor a temperaturas superiores a los 60°C y no se desarrollan a

temperaturas de la región mesofílicas. A éstas se les llama termófilas verdaderas, termófilas obligatorias o estenotermófilas (Pélczar, Reid y Chan 1982).

La temperatura de incubación que permite el desarrollo bacteriano en un período corto (de 12 a 24h) se llama temperatura óptima de crecimiento. Aunque cabe señalar que la temperatura óptima de crecimiento puede no serlo para otras actividades celulares (Pélczar, Reid y Chan 1982).

10) Necesidades de gases. Los gases principales que afectan el desarrollo bacteriano, son el oxígeno y el dióxido de carbono. Las bacterias presentan una respuesta amplia y variable al oxígeno libre y en base a ello se dividen en cuatro grupos:

- Aerobias: bacterias que se desarrollan en presencia de oxígeno libre.
- Anaerobias: bacterias que se desarrollan en ausencia de oxígeno libre.
- Anaerobias facultativas: bacterias que se desarrollan tanto en presencia como en ausencia de oxígeno libre.
- Microaerófilas: bacterias que crecen en presencia de pequeñísimas cantidades de oxígeno libre (Pélczar, Reid y Chan 1982).

11) Acidez o alcalinidad. En la mayor parte de bacterias el pH óptimo de crecimiento está entre 6.5 y 7.5, aunque algunas bacterias pueden desarrollarse a pH extremos, en la mayor parte de las especies los límites mínimos y máximos corresponden a cualquier punto entre pH 4 y pH 9 (Pélczar, Reid y Chan 1982).

Cuando se cultivan bacterias en un medio que originalmente se ajustó a un pH determinado es muy probable que el pH cambie como resultado de las sustancias producidas por los microorganismos, las cuales pueden ser ácidas o básicas. El cambio de pH puede ser tan notable que el desarrollo posterior de los microorganismos acabe por inhibirse. Estos cambios tan radicales en el pH se pueden prevenir mediante la

incorporación de un elemento amortiguador de éste, en el medio de cultivo (Pélczar, Reid y Chan 1982). Los amortiguadores son compuestos o parejas de compuestos que pueden resistir cambios en el pH. En bacteriología se emplea generalmente la combinación de KH_2PO_4 y K_2HPO_4 (Pélczar, Reid y Chan 1982). Algunos ingredientes nutritivos en los medios de cultivo, como la peptona, también poseen algo de capacidad amortiguadora. La extensión con que un medio de cultivo debe atenuarse dependerá del propósito para el que se va a usar y estará limitado por la capacidad amortiguadora de los compuestos usados (Pélczar, Reid y Chan 1982).

12) Otras necesidades físicas. Las bacterias, además de las ya mencionadas, pueden presentar necesidades adicionales. Por ejemplo, los organismos fotosintéticos deberán ser expuestos a una fuente de iluminación ya que la luz es su fuente de energía. El desarrollo bacteriano también es influido por las condiciones de presión osmótica e hidrostática. Otras, las llamadas holofílicas, se desarrollan sólo si el medio de cultivo contiene extraordinarias concentraciones de sal (del 10 al 15%). Esto representa una respuesta a la presión osmótica (Pélczar, Reid y Chan 1982).

c. Selección de los medios de cultivo y condiciones de incubación. Cuando se examina una muestra para buscar una bacteria en concreto, el conocimiento de sus características puede hacer posible la selección de un medio de cultivo apropiado, así como el tipo de incubación adecuado. Si el problema, por ejemplo, es de cultivar muchas bacterias que se encuentre en una muestra de leche, el único grupo de nutrición que se puede excluir antes de manejarla será el de los autótrofos obligatorios. Por consiguiente, se deberán procurar condiciones de cultivo para aerobios, anaerobios, psocrófilos, mesófilos y termófilas, así como para heterótrofas exigentes y no exigentes. Un estudio tal, necesitará que se inoculen muchos y variados medios de cultivo así como diferentes tipos de incubación (Pélczar, Reid y Chan 1982).

El **método de vertido** es el más utilizado para el recuento bacteriano. Es importante el conteo de colonias para conocer la velocidad con que se reproducen y calcular el

número de bacterias por volumen de solución (**UFC**: unidades formadoras de colonias) (Henríquez y Donado 2005).

Mediante la marca de Fluorocult®, la casa Merck denomina a varios medios de cultivo sólidos y líquidos los cuales adicionalmente tienen fluorescencia óptica para la detección de *E. coli*, y en algunos casos, también es posible detectar la formación de indol del triptófano. El método de *Fluorocult® Caldo de Brila* es usado para un enriquecimiento selectivo y para el conteo total utilizando la determinación de *E. coli* y otras coliformes. Por ejemplo, en el análisis de aguas (Gerba, Pepper y Rose 2000).

La detección de *E. coli* es rápida y confiable mediante 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido (MUG) que es el sustrato de la β -D-glucuronidasa, que es el método aceptado en la literatura científica.

El principio a utilizar es:

MUG: metilumbeliferil-glucurónido (sin color) + **β -D-glucuronidasa** (de *E. coli*) \rightarrow
ácido glucurónico + metilumbeliferón (fluorescente)

La bilis y el verde brillante inhiben en gran medida el crecimiento de bacterias acompañantes, en particular las bacterias gram – positivas. La utilización de luz ultravioleta(UV) de longitud de onda de 366nm hace fluorecer el metilumbeliferón con fluorescencia azul en el tubo indica la presencia de *E. coli*. Para la confirmación, se agrega al cultivo 1mL. de reactivo de Kovac para la prueba del indol. Una línea color rojo-cereza después de 1 ó 2 minutos confirma la presencia de *E. coli*. El gas de fermentación en los tubos sugiere la presencia de *E. coli* u otras bacterias coliformes (Gerba, Pepper y Rose 2000).

10. Desinfectantes. Los desinfectantes son sustancias que tienen propiedades antimicrobianas, es decir, eliminan a los microorganismos que pueden ser patógenos. La acción desinfectante está ligada a los principios o sustancias activas que contienen (OMS 1983).

Entre los principales principios activos están el fenol, aceite de pino, cresol y alcohol isopropílico, los cuales son complementados con sustancias emulsificantes u otros ingredientes inertes como colorantes, fijadores y agua, que les brindan propiedades específicas. La cantidad del principio activo que contenga es la que definirá el poder del desinfectante así como su efectividad, además de cuidar que no contengan sustancias tóxicas para el ser humano o animales, es decir, debe ser en lo posible no contaminantes al ambiente (Solé, Alonso y Constans 1997).

El cloro (Cl_2) ha sido utilizado mundialmente como un desinfectante químico, sirviendo principalmente como una barrera para los contaminantes microbianos del agua para beber (World Health Organization 2000).

El notable factor biocida del cloro a causa de la formación de un desinfectante derivado, (DBP), ha generado la preocupación hacia la salud pública durante el proceso de cloración. Como consecuencia, se han utilizado desinfectantes químicos alternativos como el ozono, O_3 , el dióxido de cloro, ClO_2 y cloraminas (NH_2Cl). Sin embargo se ha demostrado que cada uno de estos también puede generar su propio juego de DBPs (OMS 1983).

Dado que la calidad microbiológica del agua no varía entre dichos desinfectantes, se están desarrollando medidas para lograr un mejor equilibrio entre la reducción de microorganismos y el riesgo químico que los desinfectantes producen con el fin de disminuir los riesgos a la salud al evitar la producción de DPBs (OMS 1983).

Los iones Cloro³⁶ son rápidamente absorbidos por el cuerpo, algunos se cree pueden adquirirse en las piscinas cloradas y su presencia puede ser detectada en la orina al excretar cloruro. Sin embargo, la otra mitad permanece en el organismo. De forma similar puede comportarse el clorato en el organismo (World Health Organization 2000).

a. Toxicología de desinfectantes y derivados del desinfectante. El gas cloro, las cloraminas y el dióxido de cloro son fuertes irritantes del sistema respiratorio. El hipoclorito de sodio (NaOCl) también se encuentra relacionado al envenenamiento en humanos. Sin embargo, existen pocas evaluaciones realizadas de los efectos tóxicos de estos desinfectantes en el agua para consumo humano o en animales. Algunos estudios indican que las soluciones de hipoclorito, cloraminas y dióxido de cloro probablemente contribuyen al desarrollo de cáncer o cualquier otro efecto tóxico. Por tanto, la atención se ha enfocado en la amplia variedad de derivados químicos que se obtienen como resultado de las reacciones del cloro y otros desinfectantes con sustancias presentes en el medio o que normalmente se encuentran en todas las fuentes de agua (World Health Organization 2000).

b. Cloro. El cloro es un gas a temperatura y presión normales y puede ser comprimido como líquido y almacenado en contenedores cilíndricos. Debido a que el gas cloro es venenoso, éste se disuelve en agua utilizando el vacío y la solución concentrada es aplicada en el agua para su tratamiento. En las plantas pequeñas se utilizan cilindros de aproximadamente 70kg. El cloro también está disponible en forma granular como hipoclorito de calcio (Ca(OCl)_2) o en forma de líquido como hipoclorito de sodio (NaOCl). (World Health Organization 2000).

El cloro es utilizado en forma de cloro gaseoso o hipoclorito (OCl^-). De cualquier forma, actúa como un agente oxidante potente y a menudo genera reacciones alternas que se dan por el exceso de cloro agregado para el proceso de desinfección. Como agente oxidante, el cloro reacciona con una gran variedad de compuestos, en particular los agentes reductores como el sulfuro de hidrógeno [H_2S], manganeso(II), hierro (II), sulfitos [SO_3^{2-}], bromuro, Br^- , yoduro [I^-], nitritos, etc. formando una gran variedad de DBPs. El gas cloro se hidroliza en agua casi completamente para formar ácido hipocloroso (HOCl). El ácido hipocloroso se disocia en iones hidrógeno (H^+) y en iones hipoclorito. El ácido hipocloroso tiene un pK_a de aproximadamente 7.5 a 25 °C. Es el primer agente desinfectante que actúa ya que es dominante a pH inferiores a 7.5 y es más

efectivo que el ion hipoclorito, que domina en los pH superiores a 7.5. Los porcentajes de descomposición de las reacciones del cloro aumentan en las soluciones si son más alcalinas en las cuales teóricamente se puede producir clorito y clorato (ClO_3^-). Durante la electrólisis del cloruro en las soluciones cuando los componentes aniónicos y catiónicos no están separados, el cloro formado en el ánodo puede reaccionar con el álcali formado en el cátodo. Por otra parte, el ácido hipocloroso/hipoclorito (o ácido hipobromoso/hipobromito, HOBr/OBr^-) puede ser formado por la reacción del cloruro, o bromuro, en soluciones neutras o alcalinas. La descomposición de hipohalitos (XO^-) es favorecida en soluciones alcalinas. Los oxhalitos formados pueden ser convertidos en oxalatos estables (World Health Organization 2000).

Otra reacción puede suceder en aguas que contienen ion bromuro e hipoclorito, esto es la formación de ácido bromoso. El producto de ácido hipobromoso es un mejor agente halogenador que el ácido hipocloroso que interfiere comúnmente con los procedimientos analíticos del cloro libre. La presencia de bromuro en las soluciones de hipoclorito puede finalmente llevar a la formación de bromato (BrO_3^-). (World Health Organization 2000).

c. Ácido peracético $\text{CH}_3\text{CO}-\text{OOH}$. Es un líquido transparente, respetuoso con el medio ambiente, que no forma subproductos. Es un biocida de amplio espectro, fuente de oxígeno (7% mínimo), sin cloro que se utiliza para la desinfección de cualquier elemento susceptible a la contaminación (Solé, Alonso y Constans 1997).

Es un preparado comercial de 90% de peróxido de hidrógeno, ácido acético y ácido sulfúrico como catalizador. Es explosivo en forma pura; comúnmente se utiliza en solución y se transporta en envase con un sistema de ventilación que previene el aumento de la presión cuando el oxígeno se libera (Solé, Alonso y Constans 1997).

B. JUSTIFICACIÓN

En las granjas de producción de pollos de engorde, la limpieza y los procesos de sanitización son de vital importancia para lograr su buen desarrollo, así como la prevención de enfermedades que afectan de manera muy drástica a estos animales. La cama que se utiliza en las galeras para el engorde de estas aves es de aserrín, material de desecho de las carpinterías y aserraderos, teniendo la capacidad de guardar humedad, haciéndolo un ambiente ideal para el desarrollo de bacterias, hongos, además de almacenar los desechos de las aves, que pueden transportar parásitos, microbios y virus patógenos.

Sabiendo que el ácido peracético, el ácido peracético más ácidos orgánicos y el Farm Fluid® son sustancias biodegradables y debido a que no se cuenta con información sobre el efecto de estas sustancias sobre la carga microbiológica en las camas de aserrín de las galeras de los pollos de engorde, se hace necesario realizar este estudio, que contribuye a prevenir y evitar la diseminación de enfermedades que pueden ser transmitidas por estas aves al ser humano. Además con este tratamiento, se pretende que el aserrín pueda ser reutilizado y así disminuir los costos de producción y evitar el uso de cloro que causa efectos nocivos al ambiente, a la biodiversidad y a la salud humana.

C. OBJETIVOS

1. Objetivo general:

Establecer el efecto sobre la carga microbiana en camas de pollos de engorde utilizando ácido peracético (Hyperox ®), ácido peracético mas ácidos orgánicos (Virkon®) y Farm Fluid® como desinfectantes, en tres concentraciones, en una granja del departamento de Alta Verapaz.

2. Objetivos específicos:

a. Realizar un conteo aeróbico total por el método de dilución en placa, determinación coliformes totales y *Escherichia coli* por el método del Número Más Probable (NMP/100mL) en camas de aserrín y el agua utilizadas en las galeras de pollos de engorde para determinar su carga microbiológica.

b. Aplicar diluciones de 1:100, 1:500 y 1:1000 de los desinfectantes: ácido peracético(Hyperox ®), ácido peracético mas ácidos orgánicos (Virkon®) y Farm Fluid®, para establecer su efecto sobre la carga microbiana en las camas de pollos de engorde.

c. Repetir los conteos microbiológicos en una y dos semanas.

D. HIPÓTESIS

Hipótesis nula:

Ho: No existe diferencia estadísticamente significativa en el conteo aeróbico total, determinación de coliformes totales y *Escherichia coli*, al aplicar los tres tratamientos de los desinfectantes seleccionados, en tres concentraciones distintas, a camas de pollos de engorde.

Hipótesis alternativa:

H1: Existen diferencias estadísticamente significativas en el conteo aeróbico total, determinación de coliformes totales y *Escherichia coli*, al aplicar los tres tratamientos de los desinfectantes seleccionados, en tres concentraciones distintas, a camas de pollos de engorde.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Materiales a utilizar

1. Recursos humanos

- Estudiante investigador
- Asesor del proyecto
- Personal a cargo de la granja

2. Materiales de laboratorio:

- Asa bacteriológica calibrada
- Tubos de ensayo de 15mm x 175mm con tapón de rosca
- Campanas de Durham
- Pipetas serológicas de 10mL, 1mL
- Gradillas de metal para los tubos
- Balanza semianalítica
- Medio de cultivo Fluorocult® caldo Brila marca Merck.
- Medio de Cultivo Plate – Count agar marca Merck.
- Espátulas
- Varillas de vidrio para agitación
- Matraces de 250mm y 125mm
- Campana bacteriológica
- Autoclave
- Cinta indicadora para autoclave
- Papel kraft
- Encendedor para flamear
- Cajas de Petri desechables de 100mm de diámetro
- Contador de colonias de Québec
- Solución de cloro al 1% como desinfectante

- Alcohol isopropílico al 70%
- Algodón en rama
- Bolsas plásticas estériles
- Frascos plásticos estériles para muestra de agua
- Agua destilada

3. Materiales de campo:

- Granja productora de pollos de engorde en el departamento de Guatemala.
- Vehículo
- Bata blanca
- Redecilla
- Botas desinfectadas
- Probeta de plástico de 100mL
- Hielera
- Refrigerante
- Desinfectantes
 - Farm Fluid®
 - Virkon®
 - Hyperox®
- Computadora personal
- Impresora
- Hojas para reporte
- Marcador
- Calculadora
- Cámara fotográfica

B. PROCEDIMIENTOS:

1. Ubicación. El estudio se realizó en la granja “Estrellita”, del municipio de Cobán, departamento de Alta Verapaz, aledaña al campo de aviación, zona 6 de esta ciudad.

2. Criterio de selección. Se seleccionó esta granja porque es de alto riesgo, ya que no cuenta con las medidas mínimas de bioseguridad:

No existe un sistema de control de ingreso – egreso de vehículos y personal.

El área no está delimitada por un cerco perimetral que evite el ingreso de personas y animales.

El personal no cuenta con la instrucción ni indumentaria adecuada.

Las instalaciones también son deficientes en cuanto a las medidas de seguridad para las aves (agujeros en la pared, techo sin malla de protección).

La fuente de agua no presenta las condiciones adecuadas.

No hay un área para lavado de manos.

No hay pediluvios con solución desinfectante.

No hay un manejo adecuado en el control de desechos.

3. Análisis de aguas

a. Toma de muestras. Se dejó fluir el chorro de agua que se utiliza en la granja para la limpieza de las instalaciones por 3 minutos antes de tomar la muestra. Se limpió con gasa y con un hisopo con alcohol y se flameó con encendedor. Se abrió el chorro y se llenaron $\frac{3}{4}$ de un recipiente plástico estéril. La muestra se transportó con hielo en una hielera hacia el laboratorio para su análisis.

b. Conteo total de colonias: método de placa vertida. Se colocó 1ml de muestra en cada una de las 2 cajas de Petri estériles identificadas. Posteriormente se agregaron 15ml de medio (Plate Count Agar a 42°C), se agitó por la técnica de los

“ocho- ochos”, se incubaron, una a 37°C y otra a temperatura ambiente por 24h. Posteriormente, se obtuvo el conteo de las UFC presentes en cada placa.

c. Análisis mediante el método del Número Más Probable o NMP, utilizando Fluorocult®. A una batería de 9 tubos previamente identificados que contenían 9ml de Fluorocult® Caldo de Brila, utilizando una pipeta estéril se agregaron 10ml de agua a cada uno de 3 tubos (doble concentración), 1ml y 0.1ml respectivamente a 3 tubos de concentración simple. Los tubos se incubaron por 24 horas a 37°C.

Para realizar las lecturas se observó:

- Color verde y presencia de gas en el tubo de Durham significa presencia de coliformes.
- Fluorescencia azul en luz UV a 366nm indica presencia de *E. coli*.

Para la confirmación, se agregó al tubo 1mL de reactivo de Kovac's para la prueba del indol. Una línea color rojo-cereza después de 1 ó 2 minutos confirma la presencia de *E. coli*. El gas de fermentación en los tubos sugiere la presencia de *E. coli* u otras bacterias coliformes.

Para interpretar los resultados se comparó el número de muestras positivas con la tabla del NMP/100mL para 3 tubos de distinta dilución que se encuentra en el apéndice en el cuadro 10.

4. Análisis del aserrín antes del tratamiento

a. Toma de muestras control. Se tomó una muestra de aserrín utilizado para las camas en las galeras de pollos en el día en el que el lote de pollos fueron llevados al rastro. A dicha muestra posteriormente se le aplicó el tratamiento de desinfectantes. Se hizo una mezcla de la cama de aserrín a tratar en una bolsa estéril.

Se tomaron 20g de aserrín de la mezcla anterior y se agregó en 200 ml de agua en una bolsa estéril. Las muestras se agitaron por 30 segundos. Se tomaron las alícuotas

correspondientes para el conteo total y determinación de coliformes por el método del NMP/100mL.

5. Aplicación de los tratamientos. Se prepararon nueve bloques de 1m² de 5 cms de espesor para aplicarles las diluciones de los desinfectantes.

a. Dilución de los desinfectantes. Se hicieron las diluciones de los desinfectantes utilizando agua municipal del grifo. Se preparó un litro de cada desinfectante en cada dilución para aplicar a cada uno de los bloques hechos con el material de las camas de pollos. Las diluciones utilizadas fueron 1:100, 1:500 y 1:1000 de cada uno de los tres desinfectantes.

b. Aplicación de los desinfectantes a las camas. Se rociaron los bloques de camas de pollos con un litro de desinfectante cada uno. Posteriormente se analizaron los bloques en las siguientes dos semanas.

6. Toma de muestras semanal. Al cabo de una semana de aplicado el tratamiento, se tomaron 20g de una mezcla de aserrín de los bloques de camas elegidas aleatoriamente de cada desinfectante utilizado y se mezclaron con 200ml de agua destilada estéril (dilución 1:10 p/v).

Se realizó el conteo total de colonias utilizando el método de vertido en placa de manera similar al inciso 1.b de la metodología. Además se realizaron las diluciones de 1:100 y 1:1000 y se procedió al análisis de NMP/100mL con Florocult caldo de Brila ® de manera similar al inciso 1.c de la metodología.

Se repitió el procedimiento de la semana anterior para realizar el NMP/100mL y conteo de colonias.

III. RESULTADOS

Cuadro 1: conteo total de colonias a 25 y 37°C NMP/100mL de coliformes totales y determinación de *E. coli* en muestra de agua de la granja.

muestra	AGUA
conteo total 25°/ 48h	370
conteo total 37° C	850
NMP/100mL	<3
E. Coli	<3
INDOL	-
GAS	-
FLUORESC.	-
TURBIDEZ	-

Cuadro 2: conteo total de colonias a 25 y 37°C, NMP/100mL de coliformes totales y determinación de *E. coli* en la cama de pollo de engorde antes de aplicar los tratamientos.

muestra	Cama de pollo
Conteo total 25°/ 48h	65000
conteo total 37° C	101000
NMP/100mL	>1100000
E. Coli	>1100000
INDOL	+
GAS	+
FLUORESC.	+
TURBIDEZ	+

Cuadro 6: NMP/100mL de *E. coli* en las camas de pollos de engorde después de 1 y 2 semanas de aplicados los tratamientos.

Tratamiento/ dilución	Semana 1			Semana 2		
	Virkon	Farm Fluid	Hyperox	Virkon	Farm Fluid	Hyperox
1:100	>1100000	3000	>1100000	>1100000	290000	>1100000
1:500	>1100000	>1100000	>1100000	>1100000	>1100000	>1100000

Cuadro 7: Resultados de la prueba F del análisis de varianza de los conteos totales a 25 y 37°C, NMP/100mL de coliformes totales y *E. coli* en las semanas 1 y 2 después de aplicado el tratamiento a las camas de pollos de engorde.

	F experimental	F crítico
Semana 1. Conteo total a 25°C	0.47368421	5.14324938
Semana 2. Conteo total a 25° C	0.36470588	5.14324938
Semana 1. Conteo total a 37°C	1.0212766	5.14324938
Semana 2. Conteo total a 37°C	0.74301676	5.14324938
Semana 1. NMP/100mL de coliformes totales	1	5.14324938
Semana 1. NMP/100mL de <i>E. coli</i> .	1	5.14324938
Semana 2. NMP/100mL de <i>E. coli</i> .	1	5.14324938

IV. DISCUSIÓN

Las camas de pollos de engorde son reservorios de gran cantidad de microorganismos y generalmente se desechan después de utilizarlas una vez. Al aplicar el tratamiento desinfectante adecuado dichas camas podrían reutilizarse y de esta forma evitar el gasto de una nueva cama, y lo más importante es que se reduce el material de desecho de las granjas que únicamente contamina el ambiente. Además de los microorganismos presentes por las heces de los pollos, pueden servir como focos de contaminación para que ciertos patógenos sean diseminados al ambiente.

Aunque es evidente que existe diferencia en la carga microbiológica de las camas al aplicar el tratamiento respecto a la carga inicial, al realizar el análisis de varianzas de una vía se encuentra que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los distintos tratamientos así como entre las distintas concentraciones.

Esto da un panorama más claro sobre la cantidad de microorganismos que se liberan al ambiente al desechar las camas sin ningún tratamiento, o bien, de la cantidad elevada de microorganismos que se tendrían si la cama quiere reutilizarse. Por lo tanto, se hace necesaria la aplicación de algún tratamiento desinfectante que permita disminuir dicha carga microbiana pero que a la vez sea inocuo para los pollos.

Los tres desinfectantes utilizados para este estudio son biodegradables, lo que les da una ventaja adicional a los comúnmente usados a base de cloro ya que éstos no sólo realizan el efecto microbicida sino que no dejan trazas o sustancias que se acumulen en el ambiente y que puedan ser tóxicos no solo para los animales, el ser humano y a la biodiversidad.

En la mayoría de granjas rurales no existe la costumbre de aplicar desinfectantes ni reutilizar las camas, únicamente estarían dispuestos a utilizar estos procedimientos si no implica para ellos una inversión muy elevada. Además se realizó un análisis microbiológico del agua municipal, que es la que generalmente se utiliza en la granja, para asegurarse que la carga microbiológica a medir correspondería únicamente a la proveniente de las camas de pollos y no se traería con el agua, ya que las diluciones de los desinfectantes se hicieron utilizando esta agua.

En las camas con tratamiento se observa una disminución del número de colonias respecto a la muestra control(sin tratamiento), sin embargo, al utilizar el análisis de varianza de una sola vía se determina que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los distintos tratamientos aplicados y su efecto antimicrobiano, ya que los resultados de la prueba F, el valor obtenido cae dentro del rango de aceptación y por lo tanto, no se puede concluir que alguno de estos tratamientos tenga un efecto mejor que otro respecto a la disminución de la carga microbiológica en las camas. El análisis de varianza no indicó diferencia tanto para la primera como para la segunda semana de aplicación de los tratamientos.

La segunda determinación fue el análisis de conteo total de UFC/ gramo a 37° C de las placas incubadas por 24 horas. El conteo total de colonias durante la primera semana indica una disminución de las UFC/ gramo de los tratamientos respecto a la cantidad original, sin embargo, al aplicar el análisis de varianza de una sola vía se concluye que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los conteos de colonias obtenidos en los distintos tratamientos aplicados a razón de 1 L de desinfectante por m² de cama de pollo. Los resultados obtenidos para la segunda semana después de la aplicación del tratamiento tuvieron un comportamiento similar al de la primera semana, es decir, la cantidad de UFC/ gramo fue menor en comparación con el control pero el análisis de varianza indicó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el efecto de los distintos tratamientos así como las concentraciones utilizadas de los mismos.

En la primera semana se observó que en el bloque de cama de pollo en el que se aplicó Farm Fluid® con la dilución 1:100, no hubo turbidez ni presencia de gas, por lo que según las tablas de NMP el número de bacterias coliformes presentes fue mínimo, ya que todos los tubos dieron lectura negativa. El resto de tubos dio lectura positiva. Sin embargo, al aplicar el análisis de varianza de una vía, la prueba F muestra que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los distintos tratamientos y por tanto, no se puede concluir que alguno sea mejor que otro para reducir la carga de coliformes totales al aplicar un litro de tratamiento por metro cuadrado de cama de pollo. En la segunda semana, se observó que todas las muestras dieron positivas a los distintos tratamientos. Por tanto, se hace evidente que no existe diferencia entre la aplicación de los distintos tratamientos y el número de coliformes totales encontradas después de dos semanas de aplicados los desinfectantes.

Durante la primera semana se observó que en las camas tratadas con Farm Fluid 1:100, no presentaron fluorescencia así como reacción negativa al indol. Esto significa la ausencia de *E. coli* en dichas camas lo cual coincide con los resultados del análisis de coliformes totales analizados anteriormente. Sin embargo, al realizar el análisis de varianza de una sola vía se tuvo que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los distintos tratamientos aplicados, en las tres concentraciones, en las camas de pollos de engorde. En la segunda semana de muestreo se obtuvo un aumento en el número de *E. coli* en la muestra correspondiente al Farm Fluid respecto a la semana anterior, pero nuevamente al aplicar el análisis de varianza de una sola vía los resultados muestran que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el efecto de los distintos tratamientos sobre el número encontrado de dichas bacterias, al aplicar un litro por metro cuadrado de cama de pollo.

V. CONCLUSIONES

A. Existe reducción en el conteo total de unidades formadoras de colonias, respecto al control, al aplicar los distintos tratamientos desinfectantes en sus tres distintas concentraciones.

B. No existe diferencia estadísticamente significativa en el conteo total de colonias después de una y dos semanas de aplicar los distintos tratamientos desinfectantes.

C. No existe diferencia estadísticamente significativa en el NMP/100mL de coliformes totales al aplicar los distintos tratamientos, así como sus diluciones.

D. No existe diferencia estadísticamente significativa en el NMP/100mL de *E. coli* al aplicar los distintos tratamientos y sus diluciones.

VI. RECOMENDACIONES

- A. Repetir el experimento aplicando dos y tres litros de cada desinfectante en las tres distintas concentraciones, por metro cuadrado de cama de pollo.

- B. Para el NMP/100mL utilizar diluciones de 1:100, 1:1000 y 1:10000 para aumentar el límite de detección de la prueba.

- C. Capacitar al personal operativo de las granjas avícolas en Buenas Prácticas de Manufactura y Procedimientos Estándar Operativos de Sanitización.

- D. Continuar con este tipo de estudios para establecer qué desinfectantes biodegradables pueden sustituir el uso de cloro para procedimientos de desinfección en granjas productoras de pollos de engorde.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alcamo, Edward. 2001. *Fundamentals of microbiology*. 6a edición. Estados Unidos. Jones and Bartlett Publishers. 832págs.
2. *Bayer Health care*. 2003. Bioseguridad. Virkon S®. México.
<http://www.bayervet.net/producto.jsp?PRODUCTID=26>
3. *Bayer*. Sanidad animal. Farm Fluid S®. México.
<http://www.sanidadanimal.com/catalogo.php?clave=1095B>
4. *Bayer*. Sanidad animal. Hyperox®. México.
<http://www.sanidadanimal.com/catalogo.php?clave=58250>
5. *CEBA*. 2001. Manual de pollos de engorde y gallinas de postura. Colombia.
<http://www.ceba.com.co/pollo2.htm>
6. Chile. 2001. Comisión Nacional de Buenas Prácticas Agrícolas. *Especificaciones técnicas de buenas prácticas agrícolas en la producción de aves de carne*. Chile.
http://www.buenaspracticas.cl/normas/application/lista_capitulos.php?id_rubro=7&id_manual=28&id_estruc_padre=879&ind_ref=4
7. *Du Pont*. HACCP compliant programme for food safety.
<http://www.antecint.co.uk/main/pouprogl.htm#TERMINAL>

8. Gerba, Clauss; I. Pepper. y J. Rose. 2000. *Manual de laboratorio para el análisis microbiológico de agua*. Unidad de entrenamiento e investigación en entomología médica (MERTU/G-CDC). Guatemala. 109págs.
9. Gini, Gustavo. 1995. *Manual de procedimientos para la identificación de las bacterias con importancia clínica*. 2ª edición. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. 140págs.
10. Guatemala. 1985. Comisión Guatemalteca de Normas, Ministerio de Economía. *Especificaciones de Agua Potable: COGUANOR NGO 29 001*: Guatemala. 13 págs.
11. Heizmann, Walter; P. Döller; B. Gutbrod y H. Werner. 1988. «*Rapid identification of Escherichia coli by Fluorocult media and positive indole reaction*». *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 26, No. 12. Estados Unidos. Págs. 2682-2684.
12. Henríquez, Kevin y C. Donado. 2005. *Técnicas bacteriológicas*. Atlas virtual de bacteriología. Facultad de medicina, Universidad de Panamá. http://www.telmeds.org/AVIM/Abacterio/tecnicas%20bacteriologicas/tecnicas_bacteriologicas.htm#Método_de_estrías_y_vertido
13. Levine, Mark. 1985. *Escherichia infections*. *Journal of New England Medicine*. No. 313. Estados Unidos. págs. 445-447.
14. López, Alfonso. 1991. *Factores que condicionan el confort de las aves*. *Manual de avicultura tropical*. México.
15. Nilipour, Andrés. 2005. *Preparación de instalaciones avícolas previo a la recepción de nuevos lotes*. México.

<http://www.soyamex.com.mx/nutricion%20animal/lance%202003/aves/Preparacion%20de%20Instalaciones-Amir.pdf>

16. Organización Mundial de la Salud, OMS. 1983. *Manual de bioseguridad en el laboratorio*. OMS. Suiza.

17. Pélczar, Mark; R. Reid y E. Chan. 1982. *Microbiología*. 4ª edición. Mc Graw Hill. México. 826págs.

18. Pérez, Miriam. 1994. *Manual de producción avícola*. Ediciones El manual moderno. México. 126págs.

19. Rheinheimer, Gustavo. 1987. *Microbiología de las aguas*. Editorial Acribia S. A. España. 234págs.

20. Sánchez, E. 1986. *Biosguridad, el mejor medio para prevenir enfermedades en las aves*. Revista avicultura profesional. México. Págs. 125-142.

21. Solé, Esteban; M. Alonso y A. Constans. 1997. *Desinfectantes: características y usos más corrientes*. Instituto Nacional de Higiene y Seguridad en el Trabajo. España. 147 págs.

22. Urizar, Marco. 1979. «Determinación de anticuerpos contra *Micoplasma gallisepticum* y *Micoplasma synoviae* en una población de pollos utilizando la técnica de aglutinación en placa». Tesis. Universidad de San Carlos de Guatemala. 38págs.

23. World Health Organization. *Environmental health criteria 216: desinfectants and disinfectants by-products*. Suiza. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc216.htm>

VIII. APÉNDICES

A. Glosario

Agua potable: es aquella que por sus características de calidad especificadas en esta norma, es adecuada para el consumo humano.

Bioseguridad: conjunto de prácticas de manejo orientadas a prevenir el contacto de las aves con microorganismos patógenos.

Desinfección: destrucción de todas las formas vegetativas de microorganismos excluyendo los formadores de esporas.

Grupo coliforme total: comprende todas las bacterias en forma de bacilos, aerobias y anaerobios facultativos, Gram negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y de gas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en menos de 48 horas, cuando se investigan por el método de tubos múltiples.

Grupo coliforme fecal: se define como los bacilos, Gram negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$, en menos de 24 horas, características cuando se investigan por el método de tubos múltiples de fermentación. Todas las bacterias que originan colonias oscuras (verde dorado, con brillo metálico o colonias rosadas con un punto oscuro en el centro de la colonia), en un período de 24 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, cuando se investiga por el método de las membranas de filtración.

Grupo estreptococo fecal: bacterias de forma redondeada, agrupadas en forma de cadena, que provocan una coloración púrpura en el fondo de los tubos o una turbiedad

densa a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ en un período de 24h, características cuando se investiga por el método de los tubos en fermentación. Todas las bacterias que originan colonias de color rosado a rojo oscuro a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ en un período de 48h, cuando se investigan por el método de las membranas de filtración.

Limpieza: La eliminación de tierra, residuos de alimentos, suciedad, grasa u otras materias objetables.

Recuento total de bacterias: es el cómputo del número total de colonias desarrolladas (en la suposición que una bacteria da origen a una colonia) en agar nutritivo incubado a 35°C y 20°C en un período de $24 \pm 2\text{h}$.

Sanitización: Reducción de la carga microbiana que contiene un objeto o sustancia a niveles seguros para la población.

B. Especificaciones de agua potable de la Comisión Guatemalteca de Normas, Ministerio de Economía, Guatemala, C. A. (COGUANOR 1985).

Esta norma tiene por objeto fijar los valores de las características que definen la calidad del agua potable.

Características bacteriológicas para certificar la calidad del agua potable:

Las características para agua potable estipulan el número permisible de microorganismos coliformes, en términos de las porciones normales de volumen y del número de porciones que se examina, con esta finalidad se establecen las alternativas siguientes:

Casos para los cuales ya se tiene un historial: cuando por el método de los tubos múltiples de fermentación se examinen 5 porciones de 10ml cada una, la ausencia de gas en todos los tubos se expresa como número más probable menor de 2.2 coliformes en 100ml, o sea NMP/100ml, lo cual se interpreta comúnmente como un indicador de que esa muestra aislada satisface la norma de calidad y el agua es adecuada para consumo humano.

Para nuevas introducciones de agua potable, en la evaluación de las plantas de depuración y para evaluaciones anuales se debe proceder como se indica a continuación:

- Cuando en el método de los tubos múltiples de fermentación se examinan las porciones de 10ml, 3 porciones de 1ml y 3 porciones de 0.1ml, la ausencia de gas en todos los tubos se expresa como número más probable menor de 3.0 coliformes en 100ml, lo cual se interpreta comúnmente como un indicador de que esta muestra aislada satisface la norma de calidad y el agua es adecuada para consumo humano.
- Cuando en el método de los tubos múltiples de fermentación se examinan 5 porciones de 10ml, 5 porciones de 1ml y 5 porciones de 0.1ml, la ausencia de gas en todos los tubos se expresa como número más probable menor de 2.0 coliformes en 100ml lo cual se interpreta como que esa muestra aislada satisface la norma de calidad y el agua es adecuada para el consumo humano.

En el método de los tubos múltiples de fermentación, una muestra positiva confirmada en 3 o más tubos (de porciones de 10ml o más), se indica la necesidad de una acción correctiva inmediata y de exámenes adicionales.

En forma similar se estipula en el método de las membranas de filtración, cuando el volumen normal es una porción de 100ml o más. Interpretándose en esta técnica que el

límite de calidad es de una colonia por 100ml (y colonia de coliformes/ 100ml) y que el límite en el cual deben de tomarse las medidas correctivas es de 4 o más colonias coliformes por 100ml.

Cuando el muestreo se efectúa diariamente, las muestras que se tomen en un mismo punto, después de una muestra “no satisfactoria”, se considerarán como especiales y no se incluyen en el número prescrito de muestras mensuales.

Límites: según se indique por las muestras que se examinen, la presencia de microorganismos del grupo coliforme por el método de los tubos múltiples de fermentación deben de exceder de los siguientes límites:

- Cuando se examinan porciones de 10ml, no más del 10% deben mostrar, en cualquier mes, la presencia del grupo coliforme. No será permisible la presencia del grupo coliforme en 3 o más de las porciones de 10ml de una muestra normal cuando ocurran:
 - En dos muestras consecutivas.
 - En más de una muestra mensual, cuando se examinan mensualmente menos de 20 muestras o,
 - En más de 5% de las muestras, cuando se examinan mensualmente más de 20 muestras.
- Cuando se aplique la técnica de las membranas de filtración la media aritmética de la densidad de coliformes de todas las muestras normales que se examinen en un mes no debe exceder de un microorganismo/ 100ml. El número de colonias coliformes por muestra normal no ha de exceder de 3/ 50ml, 4/ 100ml, 7/ 200ml ó 13/ 500ml en:
 - Dos muestras consecutivas.

- En más de una muestra mensual, cuando se examinan mensualmente menos de 20 muestras o,
- Más del 5% de las muestras normales, cuando se examinan mensualmente más de 20 muestras.

Cuando en una muestra normal aislada se presentan organismos coliformes en tres o más de las porciones de 10ml por el método de los tubos múltiples de fermentación o las colonias coliformes exceden los valores mencionados en la técnica de las membranas de filtración, se deben de tomar inmediatamente muestras diarias del mismo punto de muestreo y se deben examinar hasta que los resultados se obtengan, cuando menos en dos muestras consecutivas, demuestren que el agua es de una calidad satisfactoria .

Un número mayor de 500 microorganismos/ ml en el recuento total de bacterias, señala el límite en el cual deben de tomarse medidas correctivas e indicando la necesidad de una inspección sanitaria completa del sistema de abastecimiento para determinar cualquier sospecha de contaminación. El recuento total de bacterias debe tenerse únicamente en cuenta cuando la investigación del grupo coliforme no sea lo suficientemente confiable en la calidad del agua de determinados suministros de distribución. Esta especificación implica que debe realizarse el recuento en dos porciones de 1ml y dos porciones de 0.1ml en cajas de Petri por muestra examinada.

C. Medios de cultivo y procedimientos para el análisis de bacterias

Cuadro 8: necesidades nutricionales mínimas de algunas bacterias heterótrofas

Bacteria	Sales inorgánicas	Carbono orgánico	Nitrógeno inorgánico	Un aminoácido	Dos o más aminoácidos	Una vitamina	Dos o más vitaminas
<i>Escherichia coli</i>	X	X	X				
<i>Salmonella Typha</i>	X	X	X	X			
<i>Proteus vulgaris</i>	X	X	X	X		X	
<i>Staphylococcus aureus</i>	X	X	X		X	X	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	X	X	X		X		X

(Pélczar, Reid y Chan 1982: 91).

Método del número más probable (NMP)

Cuadro 9: método tradicional de NMP

<p>Las muestras deben procesarse idealmente dentro de un máximo de 6 – 8 horas. El límite permitido es de 24 horas.</p> <p>Si es necesario se deben realizar diluciones de la muestra.</p> <p>Prueba presuntiva: adicionar 10ml de la muestra en cada uno de los tubos con 10ml de caldo lauril triptosa de concentración definida.</p>	<p>Usar mechero durante este proceso.</p>
<p>Incubar por 24 – 48 hora a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.</p>	<p>Rotular los tubos apropiadamente.</p>
<p>Prueba confirmativa: a partir de cada tubo positivo a gas en la prueba presuntiva sembrar en caldo bilis verde brillante y en caldo EC.</p>	<p>Incubar los tubos con caldo bilis verde a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y los tubos con caldo EC a $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.</p>
<p>Los tubos de caldo bilis verde positivos a gas confirman la presencia de coliformes totales mientras que los tubos de caldo EC confirman la presencia de coliformes fecales.</p>	<p>Puede hacerse una prueba complementaria.</p>

Cuadro 10: NMP al 95% de confianza para 3 tubos, con 0.1, 0.01 y 0.001ml

Tubos positivos			NMP/ 100ml	Conf. lim.		Tubos positivos			NMP/ 100ml	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Inf.	Sup.	0.10	0.01	0.001		Inf.	Sup.
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

Método de Fluorocult®

Cuadro 11: método de Fluorocult®

<p>Las muestras deben procesarse idealmente dentro de un máximo de 6 – 8 horas. El límite máximo permitido es de 24 horas.</p> <p>Preparar una batería de 9 tubos con 10ml de fluorocult® cada uno.</p>	<p>Usar mechero durante este proceso.</p>
<p>Inocular cada tubo con la muestra de agua a analizar, e incubar 24 horas entre 35 – 37 °C.</p>	<p>Rotular los tubos apropiadamente.</p>
<p>Interpretar los resultados como sigue: color verde indica presencia de coliformes y la presencia de <i>E. coli</i> es indicada por fluorescencia y color rojo en la prueba de indol.</p>	

Las ventajas del método de Fluorocult® (MUG) son las siguientes:

- La reacción de la glucuronidasa es más sensible que la formación de gas, lo que significa que se tiene un diagnóstico de alta confiabilidad.
- El tiempo de trabajo se reduce en comparación con los métodos tradicionales, lo que significa que hace el trabajo más económico.
- Con los métodos tradicionales el resultado está disponible después de 96 a 144 horas, con el método de Fluorocult® es posible tener resultados después de 24 a 48 horas, es decir, de 3 a 4 días menos en la obtención de cada resultado.

Dependencia del pH para la fluorescencia

Una observación óptima de fluorescencia es obtenida a pH de 9 a 10 después de la excitación con luz UV a 366nm. Algunas cepas de *E. coli* las cuales son altamente formadoras de ácidos y/o las cuales forman pequeñas cantidades de 4-metilumbeliferón, y causan que el valor del pH decrezca y por tanto la fluorescencia es difícilmente visible.

La neutralización del pH o la adición de una sustancia alcalina es la respuesta al problema. Pueden utilizarse pequeñas cantidades de solución 1N de NaOH. Además, deben tomarse las siguientes consideraciones para evitar tener resultados falsos positivos y falsos negativos:

- La detección del indol puede ser hecha 24 horas después como máximo.
- La evaluación de la formación de indol debe ser después de la evaluación de fluorescencia.

El método de Fluorocult® para la detección de *E. coli* puede ser utilizado en la industria láctica, para el análisis de carne o derivados de la misma, en análisis de aguas, en la industria farmacéutica o de cosméticos o en diagnósticos clínicos.

D. Desinfectantes a utilizar

1. **Virkon S ®.** Es una mezcla equilibrada de ácidos orgánicos y compuestos preoxigenados tensoactivos. Es utilizado como desinfectante virucida para granja, incubadoras, plantas de procesado, equipos y agua (Bayer 2003).

Cuadro 12: Método de aplicación de Virkon ®

Función	Dilución	Modo de empleo
Lavado y desinfección de edificios y equipos	1:100-1:200	Aplicar 200-400 ml/m ²
Nebulización ambiental	1:100	Aplicar 1 l/100 m ³
Termonebulización	1:25 (+15% de propilenglicol)	Aplicar 50 l/1.000 m ²
Saneamiento ambiental	1:200	Aplicar 1 l/100 m ³
Saneamiento del sistema de agua de bebida	1:200	Llenar tanques y conducciones con la solución durante 30 minutos y vaciar
Saneamiento de huevos	1:100	
Pediluvios (baños)	1:100	

<<http://www.bayervet.net/producto.jsp?PRODUCTID=26> >

Puede obtenerse la caja con 5 sobres de 50 g y envase de 2,5 kg.

<<http://www.bayervet.net/producto.jsp?PRODUCTID=26> >

2. Farm Fluid S®. Es un desinfectante orgánico para uso pecuario que elimina microorganismos patógenos. Además, no es corrosivo ni irritante. Reduce el riesgo de infecciones microbiológicas sin contaminar el ambiente. Es un producto soluble en aceite y forma emulsiones en agua por lo que facilita su aplicación en lugares con altas cantidades de materia orgánica. Es una mezcla sinérgica y balanceada de ácidos orgánicos, biocidas orgánicos, inorgánicos y surfactantes.

Posee un amplio espectro contra virus, hongos, bacterias y algas además de ser seguro para la salud tanto humana como animal. Por tanto, puede ser utilizado en cualquier tipo de instalación, incluyendo baños, sanitarios, y otros, brindando una excelente protección contra patógenos al crear un ambiente estéril y sano. La dosis normal es 1:100 a 1:200 en agua, ya sea por aspersión, inmersión o lavado. Su presentación es por medio de un garrafón de 5 litros.

3. Hyperox®. Tiene un buen efecto contra microorganismos patógenos ya que reduce la contaminación microbiológica. Es soluble en agua y otros solventes orgánicos lo que facilita su aplicación aún en lugares con elevada cantidad de materia orgánica <<http://www.sanidadanimal.com/catalogo.php?clave=58250>>

Hyperox es una mezcla sinérgica y balanceada de compuestos preoxigenados, ácidos orgánicos y surfactantes.

Para la desinfección de instalaciones y equipos generalmente se utiliza la vía de aspersión en soluciones de 1:100 o 1:200 (v/v) y se debe aplicar una razón aproximada de 200-300 ml de mezcla por m² de superficie a tratar. En contenedores de aguas se utiliza 1:500 <<http://www.sanidadanimal.com/catalogo.php?clave=58250>>

E. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Cuadro 13: resumen del análisis de varianza de un factor para el conteo total a 25°C, en la semana 1.

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	25000	8333.33333	10333333.3
Columna 2	3	22000	7333.33333	6333333.33
Columna 3	3	28000	9333.33333	2333333.33

Cuadro 14: continuación del análisis de varianza de un factor para el conteo total a 25°C en la semana 1.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados
Entre grupos	6000000	2	3000000
Dentro de los grupos	38000000	6	6333333.33
Total	44000000	8	

Cuadro 15: análisis de varianza de un factor
para el conteo total a 25° C en la semana 2.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3	24000	8000	13000000
Columna 2	3	18000	6000	3000000
Columna 3	3	23000	7666.66667	12333333.3

Cuadro 16: continuación del análisis de varianza de un factor
para el conteo total a 25°C en la semana 2.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados
Entre grupos	6888888.89	2	3444444.44
Dentro de los grupos	56666666.7	6	9444444.44
Total	63555555.6	8	

Cuadro 17: resumen del análisis de varianza de un factor para
el conteo total a 37°C en la semana 1.

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	25000	8333.33333	9333333.33
Columna 2	3	17000	5666.66667	2333333.33
Columna 3	3	21000	7000	4000000

Cuadro 18: continuación del análisis de varianza de un factor
para el conteo total a 37°C en la semana 1.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>
Entre grupos	10666666.7	2	5333333.33
Dentro de los grupos	31333333.3	6	5222222.22
Total	42000000	8	

Cuadro 19: resumen del análisis de varianza de un factor para el conteo total a 37°C en la semana 2.

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	31000	10333.3333	50333333.3
Columna 2	3	18000	6000	7000000
Columna 3	3	22000	7333.3333	2333333.33

Cuadro 20: continuación del análisis de varianza de un factor para el conteo total a 37°C en la semana 2.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>
Entre grupos	29555555.6	2	14777777.8
Dentro de los grupos	119333333	6	19888888.9
Total	148888889	8	

Cuadro 21: resumen del análisis de varianza de 1 factor para el NMP/100mL de coliformes totales en la semana 1.

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	3300	1100	0
Columna 2	3	2203	734.333333	401136.333
Columna 3	3	3300	1100	0

Cuadro 22: continuación del resumen del análisis de varianza de un factor para el NMP/100mL de coliformes totales en la semana 1.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>
Entre grupos	267424.222	2	133712.111
Dentro de los grupos	802272.667	6	133712.111
Total	1069696.89	8	

Cuadro 23: resumen del análisis de varianza de un factor para el NMP/100mL de coliformes totales en la semana 2.

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	3300	1100	0
Columna 2	3	3300	1100	0
Columna 3	3	3300	1100	0

Cuadro 24: continuación del análisis de varianza de un factor para el NMP/100mL de coliformes totales en la semana 2.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>
Entre grupos	0	2	0
Dentro de los grupos	0	6	0
Total	0	8	

Cuadro 25: resumen del análisis de varianza de un factor para el NMP/100mL de *E. coli* en la semana 1.

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	3300	1100	0
Columna 2	3	2203	734.333333	401136.333
Columna 3	3	3300	1100	0

Cuadro 26: continuación del análisis de varianza de un factor para el NMP/100mL de *E. coli* en la semana 1.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>
Entre grupos	267424.222	2	133712.111
Dentro de los grupos	802272.667	6	133712.111
Total	1069696.89	8	

Cuadro 27: resumen del análisis de varianza de un factor para el NMP/100mL de *E. coli* en la semana 2.

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	3300	1100	0
Columna 2	3	2490	830	218700
Columna 3	3	3300	1100	0

Cuadro 28: continuación del análisis de varianza de un factor para el NMP/100mL de *E. coli* en la semana 2.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>
Entre grupos	145800	2	72900
Dentro de los grupos	437400	6	72900
Total	583200	8	

F. OTROS ANÁLISIS

Cuadro 29: conteo total de colonias a 25 y 37°C, NMP/100mL de coliformes totales y determinación de *E. coli* en aserrín comercial antes de utilizarse en la cama de pollo de engorde.

muestra	Cama de pollo
Conteo total 25°/ 48h	27000
conteo total 37° C	31000
NMP/100mL	>3000
E. Coli	>3000
INDOL	-
GAS	-
FLUORESCENCIA	-
TURBIDEZ	-