



Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2024; 15:1-11. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2024.9>

Nota de Investigación. Recibido:21/12/2022. Aceptado:19/04/2024. Publicado:17/06/2024. Clave: e2022-80.

<https://www.youtube.com/watch?v=roFA6esJL4k>

Reproducción de microorganismos de montaña para uso en agua de bebida en sector pecuario

Reproduction of mountain microorganisms for use in drinking water in the livestock sector



Tarsicio Medina-Saavedra^{*1ID}, Lilia Mexicano-Santoyo^{2ID}, Gabriela Arroyo-Figueroa^{1ID}, Carlos Herrera-Mendez^{1ID}, Emmanuel Pérez-Hernández^{1ID}, Juan Picazo-Ramírez^{1ID}

¹Universidad de Guanajuato, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Guanajuato, México. ²Instituto Tecnológico de Roque, División de Posgrado e Investigación, Km.8 Carretera Celaya-Juventino Rosas, Apartado Postal 508, C. P. 38110, Celaya, Guanajuato, México. *Autor de correspondencia: Tarsicio Medina-Saavedra. Privada Arteaga s/n, Col. Centro, C.P. 38900, Salvatierra, Guanajuato, México. E-mail: tarsicioms@hotmail.com, lilia_lasalle@hotmail.com, g.arroyo@ugto.mx, chmendez@ugto.mx, e.perezhernandez@ugto.mx, jcpicazoramirez@ugto.mx

RESUMEN

Los microorganismos de montaña se utilizan en la agricultura para mejorar la germinación y crecimiento de los cultivos y control de fitopatógenos. En el sector pecuario al ser utilizados como probióticos en el agua de bebida o en el alimento, pueden mejorar la calidad en los animales de granja. El objetivo fue recolectar y reproducir microorganismos de montaña para la elaboración de disoluciones en agua de bebida para animales. Se recolectó hojarasca de una zona poco afectada por las actividades antrópicas y se almacenó en fase sólida anaeróbica, posteriormente los microorganismos fueron reactivados en fase líquida durante 24, 48 y 72h. En la fase sólida y líquida se determinó la cuenta total de microorganismos. Se comprobó coliformes totales en los diferentes periodos de activación en fase líquida y finalmente se realizaron diluciones en agua de bebida al 20% y se determinó la cuenta total de microorganismos presentes en ellas. Los resultados muestran que el tiempo de activación influye sobre el número de poblaciones microbianas y que las diluciones al 20% no contienen la cantidad de microorganismos necesarios para ser administradas a los animales por lo cual es necesario adicionar una mayor cantidad de activados líquidos en el agua de bebida.

Palabras clave microorganismos nativos, crecimiento microbiano, probiótico.

ABSTRACT

Mountain microorganisms are used in agriculture to improve crop germination and growth and to control phytopathogens. In the livestock sector, when used as probiotics in drinking water or feed, they can improve the quality of farm animals. The objective was to collect and reproduce mountain microorganisms for the preparation of solutions in drinking water for animals. Leaf litter was collected from an area little affected by anthropic activities and stored in anaerobic solid phase, later the microorganisms were reactivated in liquid phase for 24, 48 and 72h. In the solid and liquid phase, the total count of microorganisms was determined. Total coliforms were checked in the different periods of activation in the liquid phase and finally 20% dilutions were made in drinking water and the total count of microorganisms present in them was determined. The results show that the activation time influences the number of microbial populations and that the 20% dilutions do not contain the amount of microorganisms necessary to be administered to the animals, therefore it is necessary to add a greater amount of activated liquids in the water of drink.

Keywords: native microorganisms, microbial growth, probiotic.



INTRODUCCIÓN

Los microorganismos de montaña (MM) que provienen de ecosistemas naturales poco afectados por factores antrópicos, suelen ser extraídos de un sistema natural para ser reproducidos y utilizados en la producción tanto pecuaria como agrícola (Martínez-Ocampo & Acosta, 2014), como una comunidad de microorganismos formada por hongos y bacterias (Ávila *et al.*, 2021). En el sector agrícola son utilizados para mejorar la estructura y fertilidad del suelo, la germinación de las semillas, la floración y desarrollo de los frutos y para suprimir agentes fitopatógenos en las zonas de cultivo (Tanya-Morocho & Leiva-Mora, 2019). Por otra parte, en el sector pecuario hay una gran preocupación debido al uso de antibióticos como promotores de crecimiento y sus efectos sobre la salud humana. Por este motivo, se requiere utilizar nuevas alternativas que contribuyan a mejorar la calidad en los animales de granja. En este sentido, el uso de probióticos en la dieta del ganado puede contribuir a mejorar la calidad de estos (Al-Shawi *et al.*, 2020).

En el sector pecuario, los microorganismos suelen ser administrados como probióticos en el alimento o el agua de bebida, debido a que pueden reducir las enfermedades entéricas y mejorar los parámetros de producción (Melara *et al.*, 2022). Los probióticos administrados a los animales son principalmente bacterias, aunque algunos hongos también pueden cumplir la función de probióticos ya que pueden estimular el crecimiento de las comunidades bacterianas benéficas y de esta manera mejorar la flora intestinal y la inmunidad (Banick *et al.*, 2019). Los mecanismos que se les han atribuido son: la interacción directa con las células del huésped, la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos y la modulación de las respuestas inmunes por parte del huésped (Karimi-Torshizi *et al.*, 2010). Por lo antes mencionado, el objetivo de este trabajo fue recolectar y reproducir microorganismos de montaña para la elaboración de disoluciones en agua de bebida que se puedan ser utilizadas como probióticos en el agua de bebida en el sector pecuario animales de granja.

MATERIAL Y MÉTODOS

Captura de microorganismos y almacenamiento en fase anaeróbica

La captura y reproducción de los Microorganismos de Montaña (MM) se llevó a cabo en dos etapas. La primera etapa consistió en recolectar 3 Kg hojarasca en estado descomposición del cerro de Culiacán ubicado en Salvatierra, Guanajuato, México con coordenadas 20°19'58"N 100°58'52"O a 2,509 msnm de acuerdo con Google earth. En una primera etapa la hojarasca fue colocada en un recipiente de 20 L y se mezcló con 6 kg de harina de maíz (*Zea mays* L.), 1.5 kg de melaza y 2 L agua hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente se realizó la prueba de puño de acuerdo con Restrepo (2007), la cual se utiliza para medir el porcentaje de humedad en el sustrato. La mezcla fue compactada en un recipiente de 20 L, el recipiente fue cerrado y sellado



para evitar la presencia de oxígeno y se reservó por un periodo de 30 días. Transcurrido el periodo se repitió el proceso en una segunda etapa, tomando 10 kg de producto anterior y se mezclaron con 6 kg de harina de maíz, 1.5 kg de melaza y 2 L agua y se reservó durante un periodo de 30 días fase anaerobia.

Activación de microorganismos en fase líquida

Para la reactivación de los microorganismos se utilizaron 3 recipientes que contenían 100 g de melaza disuelta en 20 L de agua no clorada. Adicionalmente, se cortaron 3 tramos de manta cruda de 30 X 30 cm en los cuales se envolvieron 500 g de muestra en fase sólida. Posteriormente, las mantas fueron sumergidas en los recipientes (una muestra por envase) y se le incorporó oxígeno mediante una bomba de aireación para pesera. Cada recipiente correspondía a un periodo de activación, es decir, el tiempo de incorporación de oxígeno, siendo así que se tuvieron tres periodos de activación 24, 48 y 72 h. Finalmente, con los activados líquidos se prepararon diluciones a una concentración del 20% de MM de acuerdo con lo sugerido por [Restrepo & Agredo \(2020\)](#) para especies menores.

Cuenta total de microorganismos

Para determinar la cuenta total de microorganismos presentes en las muestras, se tomó 1 g de muestra de la fase sólida y 1 mL en el caso de la fase líquida (24, 48 y 72 h) y las diluciones al 20%, y se realizaron diluciones en serie de 10^{-1} hasta 10^{-6} . Posteriormente se tomaron alícuotas de 100 μ L de cada una de las diluciones y se realizó la siembra en placa en medio de cultivo sólido de Agar Dextrosa y papa (PDA), para el crecimiento de hongos y agar nutritivo para el crecimiento bacteriano (por triplicado). Las placas inoculadas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 24h. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el conteo de las colonias bacterianas y se determinaron las UFC/mL. Para el análisis de los datos correspondientes a la fase líquida y las diluciones al 20% de los diferentes tiempos de activación se realizó un ANOVA ($\alpha=0.05$) y una prueba de Tukey para la comparación de medias. Para la fase sólida se realizó una prueba t ($\alpha=0.05$). Los datos se presentan como Log_{10} UFC/mL para la fase líquida y Log_{10} UFC/g de muestra para la fase sólida y se presentaron como la media \pm desviación estándar.

Determinación de coliformes totales

La determinación de bacterias coliformes totales en la fase líquida fue realizada mediante el número más probable (NMP) según el protocolo propuesto por [Malkawi & Mohammad \(2003\)](#) con algunas modificaciones. Para lo cual se prepararon tubos con caldo lauril triptosa que fueron inoculados con muestras de la fase líquida de 24, 48 y 72h de activación. Los tubos inoculados con los activados líquidos fueron incubados a 35°C durante 24-48 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron alícuotas de 100 μ L

de los tubos positivos (con presencia de gas) y se inocularon cajas Petri que contenían medio Eosina y Azul de Metileno (EMB) para confirmar la presencia de coliformes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase sólida anaerobia y fase líquida aerobia

En la Figura 1 se muestran las fases utilizadas para la reproducción y activación de los microorganismos de montaña recolectados. En el inciso (a) se observa la fase sólida anaerobia al momento de estar sellada y al momento de abrirla donde no se observa crecimiento micelial sobre la superficie del preparado. En el inciso (b) se observa que conforme pasa el tiempo la coloración se torna más intensa en relación con su coloración inicial, debido al crecimiento exponencial de los microorganismos

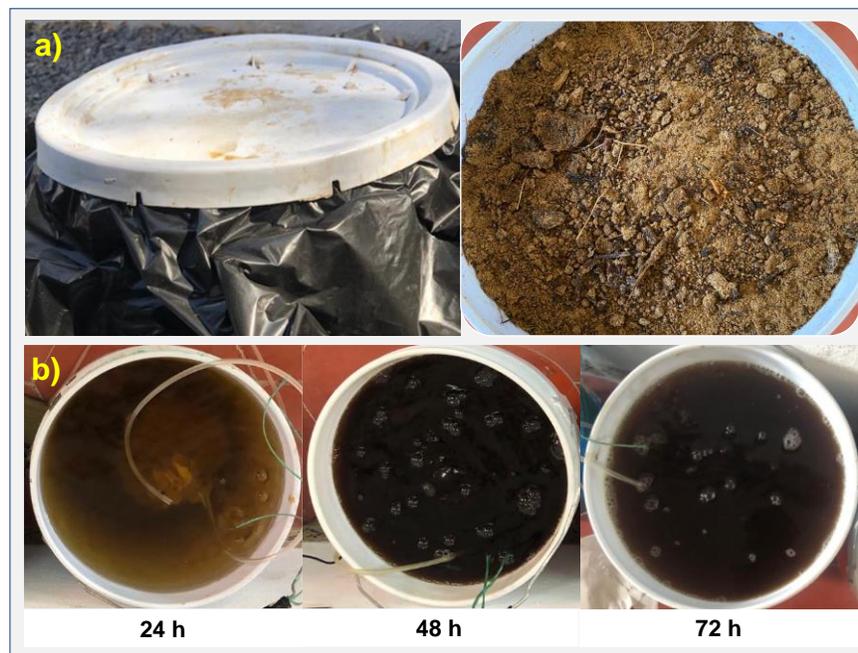


Figura 1. Reproducción de MM. a) Fase sólida anaerobia y b) Fase líquida aerobia

Méndez (2019) informa que 21 días después de la preparación de la fase sólida hubo presencia de hongos filamentosos en la superficie de la mezcla sólida, además de que esta presentaba un olor agridulce, lo que indica un buen proceso de fermentación, además comenta la presencia de levaduras en la fase líquida. En el presente trabajo, se detectó un aroma dulce, mayoritariamente a melaza. Por otra parte, como se muestra en el inciso a y el inciso b, no se observó la presencia de hongos en la superficie de la fase sólida, ni levaduras en la fase líquida. En cuanto a los activados en fase líquida, se puede observar que el color de los activados se vuelve más intenso con el aumento del tiempo de activación, es un indicativo del aumento de las poblaciones con el aumento del tiempo.



Cuenta total de microorganismos

En la Figura 2 y 3 se muestran la cuenta total de microorganismos presentes en la fase sólida y líquida en dos tipos de medio de crecimiento (Agar nutritivo y PDA), respectivamente. En la Figura 2 se observa que el número total de microorganismos es de $5.76 \pm 0.09 \text{ Log}_{10} \text{ (UFC/g)}$ y $5.63 \pm 0.07 \text{ Log}_{10} \text{ (UFC/g)}$ en agar nutritivo y PDA respectivamente. Por lo tanto, el promedio de crecimiento microbiano en fase sólida anaerobia es de $5.70 \pm 0.09 \text{ Log}_{10} \text{ (UFC/g)}$. Además, se observó que no hubo presencia de hongos en el medio PDA en los tres tiempos de activación.

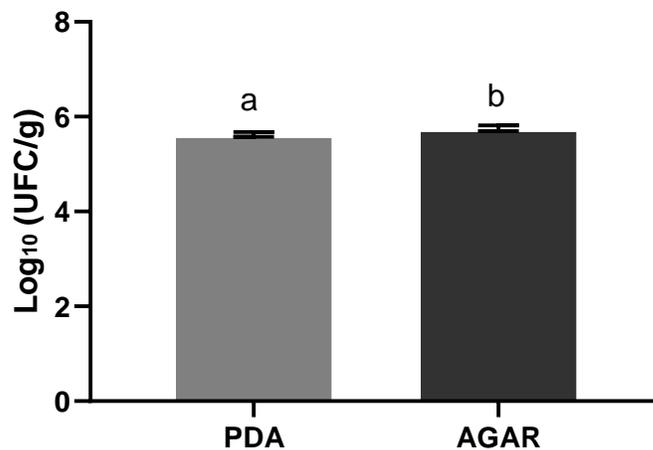


Figura 2. Número total de microorganismos presentes en la fase sólida

En la Figura 3 se presentan el número de poblaciones microbianas en fase líquida aerobia en la cual se observa que el número de microorganismos incrementa de 5.60 ± 0.02 y $3.75 \pm 0.05 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ a las 24 h a 8.22 ± 0.12 y $8.28 \pm 0.23 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ a las 48 h de activación. Los resultados muestran un mayor incremento en el número de las poblaciones microbianas de las 24 h a las 48 h de activación, siendo estadísticamente diferentes. Por otra parte, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tiempos 48 y 72 h, este fenómeno se observó en los dos tipos de medio de cultivo utilizados. Además, al igual que en la fase sólida, no se observó crecimiento de hongos en el medio de PDA de ninguno de los activados líquidos.

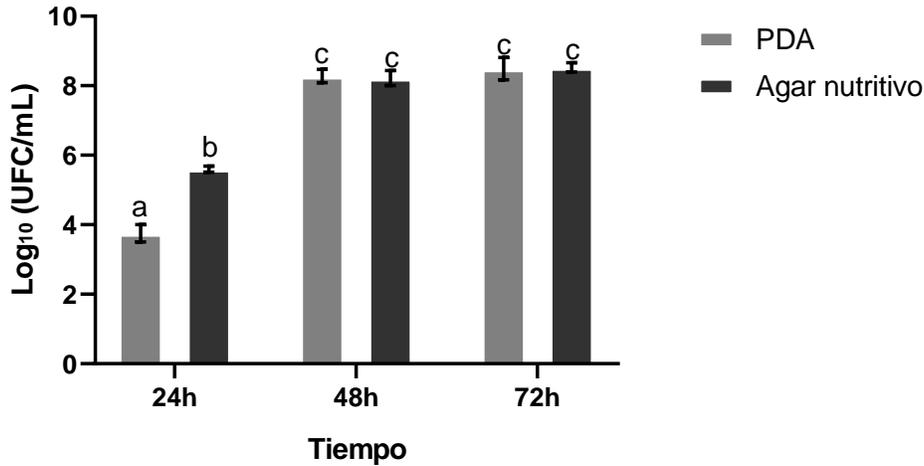


Figura 3. Número total de microorganismos presentes después de 24, 48 y 72 horas de activación en fase líquida en medio sólido agar nutritivo y PDA

Castro-Barquero & González-Acuña (2021) reportan un valor superior a 8 log₁₀ UFC/mL en activados líquidos de MM durante el día 4. Medina-Saavedra *et al.* (2021) informaron 6.47 Log₁₀ (UFC/mL), 7.6 Log₁₀ (UFC/mL) y 7.95 Log₁₀ (UFC/mL) de muestra durante la activación de microorganismos en fase líquida a las 24, 48 y 72 horas. En el presente trabajo se observó un menor número de poblaciones bacterianas al reportado por Medina-Saavedra *et al.* (2021) durante las 24 h de activación, sin embargo, las poblaciones obtenidas durante las 48 y 72 h de activación superaron a las reportadas por los autores. Cervantes, (2016) informa presencia de hongos a partir del día 7 de activación, sin embargo, en el presente trabajo no se observó presencia de hongos en ningún tipo de activación evaluados. De acuerdo con Naylor *et al.* (2022) las propiedades del suelo, como el pH, la textura, el uso del suelo y la profundidad, son factores que influyen sobre la microbiota del suelo, por tal motivo, la zona de recolección puede influir en las poblaciones presentes en las muestras, así como en el en el tipo de especies microbianas.

Coliformes totales en fase líquida

En la Tabla 1 se presenta el número más probable (NMP) de coliformes totales en tres tiempos de activación de los MM. Se observa que el valor más bajo ocurre a las 24 h de activación (<2 NMP/ 100 mL) y el valor incrementa al aumentar el tiempo de activación a 48 h (4 NMP/100 mL) y 72 h (5 NMP/100 mL).



Tabla 1. NMP de coliformes totales presentes después de la activación de los MM en fase líquida a las 24, 48 y 72h

Tiempo de activación (horas)	NMP por 100 mL
24	<2
48	4
72	5

Según [Donald et al. \(2001\)](#) y [Petrie-Dolphin \(2022\)](#) el agua de ganado no debe superar los 5000 coliformes/ 100 mL. Por otra parte, el [Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs \(2022\)](#) comenta que el agua suministrada a los animales puede contener de 20 – 50 coliformes totales/ 100 mL, lo que sugiere que, de acuerdo con los resultados obtenidos, las soluciones con los MM activados (24, 48 y 72 h) contienen baja cantidad de coliformes, por lo tanto, son seguras y pueden ser suministradas a los animales en el agua de bebida.

Cuenta total en diluciones al 20% para su uso en agua de bebida

En la Figura 4 se muestran las poblaciones microbianas presentes en las diluciones preparadas al 20% de MM, para administrar a animales de granja elaboradas a partir de los diferentes tiempos de activación de los MM. En la Figura se observa que el menor número de microorganismos presentes en las diluciones incrementa con el tiempo de activación, siendo así que el mayor número de microorganismos se observó al preparar la dilución con MM activados por 72 h ($5.86 \pm 0.19 \text{ Log}_{10} \text{ (UFC/mL)}$)

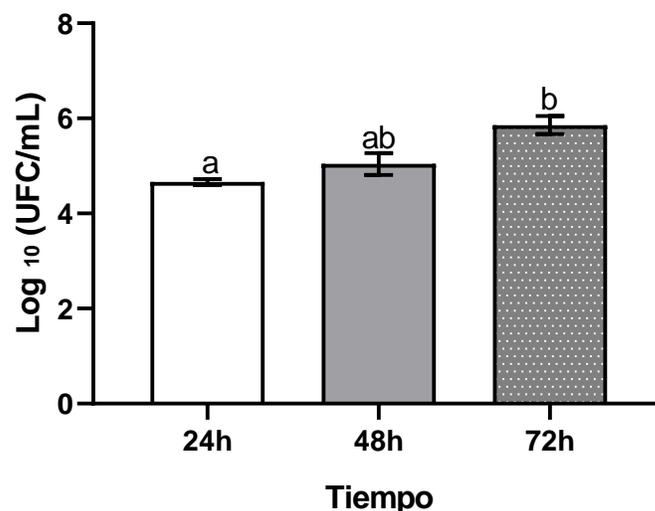


Figura 4. Cuenta total de microorganismos presentes en diluciones al 20% de MM en agua preparadas con los microorganismos activados durante 24, 48 y 72 h



Giannenas *et al.* (2014) reportan la adición de 7.39 Log₁₀ (UFC/L) y 7.69 Log₁₀ (UFC/L) como probióticos en el agua de bebida suministrada a pollos de engorda. Mansilla *et al.* (2022) administraron 7 y 8 Log₁₀ (UFC/animal/día). Li *et al.* (2021) informan una concentración de 8 log/ día suministrado como probióticos en ratones. En el presente trabajo se propone administrar soluciones al 20% preparadas con los activados líquidos, sin embargo, el mayor número de poblaciones bacterianas fue de 5.86 ± 0.19 Log₁₀ (UFC/mL), este valor se encuentra por debajo a lo reportado en las investigaciones antes mencionadas, por lo cual se podría sugerir que es necesario preparar soluciones con una concentración más alta de microorganismos para que sean administradas en animales de granja y puedan ejercer un efecto positivo sobre la salud y conversión alimenticia de los animales.

CONCLUSIÓN

Los microorganismos de montaña son una alternativa para ser utilizados como probióticos en el sector pecuario. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta la zona de recolección de estos, ya que esta influye sobre los tipos de microorganismos presentes en la muestra. Además, el tiempo de activación es un factor que influye sobre el número de las poblaciones microbianas en la fase líquida aerobia. Por otra parte, debido a que la concentración de microorganismos presente en las diluciones propuestas es baja, es necesario aumentar la cantidad de activados líquidos en el agua de bebida. Finalmente, los resultados correspondientes a coliformes totales muestran que los activados líquidos son seguros ya que contienen un número por debajo de límite permisible reportado para el agua de ganado y pueden ser suministrados a los animales en el agua de consumo.

LITERATURA CITADA

AL-SHAWI SG, Dang DS, Yousif AY, Al-Younis ZK, Najm TA, Matarneh, SK. 2020. El uso potencial de los probióticos para mejorar la salud animal, la eficiencia y la calidad de la carne: una revisión. *Agricultura*. 10 (10): 452.

<https://doi.org/10.3390/agriculture10100452>

AVILA GM de A, Gabardo G, Clock DC, Lima Junior OS. 2021. Use of efficient microorganisms in agriculture. *Research, Society and Development*. 10(8). e40610817515. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17515>



BANIK A, Halder SK, Ghosh C, Mondal KC. 2019. Probióticos fúngicos: oportunidades, desafíos y perspectivas. En: Yadav A, Singh S, Mishra S, Gupta A. (eds) Avance reciente en la biotecnología blanca a través de hongos. *Biología de los hongos*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14846-1_3

CASTRO-BARQUERO L, González-Acuña J. 2021. Factores relacionados con la activación líquida de microorganismos de montaña (MM). *Agronomía Costarricense*. 45(1): 81-92. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242021000100081&lng=en&tlng=es

CERVANTES T. 2016. Reproducción y aplicación de microorganismos de montaña. Ministerio de Agricultura y Ganadería: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/AV-1847.pdf>

DONALD L, Charle D, Stan C. 2001. Water quality for Livestock Drinking. <https://extension.missouri.edu/publications/eq381>

GIANNENAS I, Tsalie E, Triantafyllou E, Hessenberger S, Teichmann K, Mohnl M, Tontis, D. 2014. Assessment of probiotics supplementation via feed or water on the growth performance, intestinal morphology and microflora of chickens after experimental infection with *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* and *Eimeria tenella*. *Avian pathology: journal of the W.V.P.A.* 43(3): 209–216. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.899430>

GOOGLE Earth, s.f. [Mapa de El Cerro El Culiacan, Salvatierra Guanajuato, México. En Google Earth]. <https://earth.google.com/web/search/Cerro+Culiac%c3%a1n,+Guanajuato/@20.33380303,-100.98177324,2514.6103019a,3954.32318078d,35y,0h,0t,0r/data=CigiJgokCZhd5c4P6DJAEZZd5c4P6DLGWRO-fAuty5AIWAIWb1XEVXA>

LI Y, Jia D, Wang J, Li H, Yin X, Liu J, Wang J, Guan G, Luo J, Yin H, Xiao S, Li Y. 2021. Probiotics Isolated From Animals in Northwest China Improve the Intestinal Performance of Mice. *Frontiers in veterinary science*. 8: 750895. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.750895>

MANSILLA FI, FicoSeco CA, Miranda MH, Puglisi, E, Nader-Macías, ME, Vignolo GM, Fontana CA. 2022. Administration of probiotic lactic acid bacteria to modulate fecal microbiome in feedlot cattle. *Scientific reports*. 12(1): 12957. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16786-z>

MALKAWI HI, Mohammad MJ. 2003. Survival and accumulation of microorganisms in soils irrigated with secondary treated wastewater. *Journal of basic microbiology*. 43(1): 47–55. <https://doi.org/10.1002/jobm.200390004>



MARTÍNEZ-CAMPO A, Acosta Sánchez R. 2014. Evaluación de microorganismos de montaña (MM) en la producción de acelga en la meseta de Popayán. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 12(1): 80-82.

<http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v12n1/v12n1a10.pdf>

MEDINA-SAAVEDRA T, Dzul-Cauich JG, Arroyo-Figueroa G, García-Vieyra MI., Quiñones-Páramo MD, Mexicano-Santoyo L. 2021. Microorganismos de montaña y ensilado de maíz como probióticos en la engorda de conejos. *Abanico veterinario*. 11, e401. <https://doi.org/10.21929/abavet2021.7>

MÉNDEZ RC. 2019. Evaluación de Microorganismos de Montaña MM como aceleradores de compostaje par es de compostaje para la producción de cultivos aromáticos. Tesis de Licenciatura. Universidad de la Salle. Departamento de Ciencias Básicas. Bogotá D.C.

<https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1057&context=biologia>

MELARA EG, Avellaneda MC, Valdivié M, García-Hernández Y, Aroche R, Martínez Y. 2022. Probióticos: Relación simbiótica con el huésped animal. *Animales*. 12(6): 719. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ani12060719>

NAYLOR D, McClure R, Jansson, J. 2022. Trends in Microbial Community Composition and Function by Soil Depth. *Microorganisms*. 10(3): 540. MDPI AG.

<http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10030540>

KARIMI-TORSHIZI MA, Moghaddam AR, Rahimi S, Mojgani, N. 2010. Assessing the effect of administering probiotics in water or as a feed supplement on broiler performance and immune response. *British Poultry Science*. 51(2): 178–184.

<http://dx.doi.org/10.1080/00071661003753756>

MINISTRY OF AGRICULTURE, FOOD AND RURAL AFFAIRS. 2022. Water Quality for Horses - Understanding Bacterial Counts.

http://omafra.gov.on.ca/english/livestock/horses/facts/info_water_dec0398.htm

PETRIE-DOLPHIN D. 2022. Cawoodsupporting a safer, healthierplanet. Water quality and its effect on livestock: pigs and cattle. <https://cawood.co.uk/blog/water-quality-and-its-effect-on-livestock-pigs-and-cattle/>

RESTREPO-RIVERA J, Agredo-España D. 2020. Un nuevo ABC de la agricultura orgánica. Mierda de vaca. CAROLINA CARDONA. Santiago de Cali, Colombia. Pp. 482. ISBN:978-958-49-0235-1

RESTREPO-RIVERA J. 2007. El ABC de la agricultura orgánica y harina de rocas / Jairo Restrepo Rivera. 1a ed. Managua: SIMAS. Pp. 262.

<https://drive.google.com/file/d/1HMSw6KnTTHcXnL0jsS1ZmtCNrmgcdVn8/view>



TANYA-MOROCHO M, Leiva-Mora M. 2019. Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. *Centro Agrícola*. 46(2): 93-103.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852019000200093&lng=es&tlng=es

[Errata Erratum](#)

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>