Diversidad micótica asociada a heces de gallinas ponedoras, *Gallus gallus*, en dos granjas avícolas de Puerto Rico

Por
Anadeliz Sánchez Román

Tesis sometida en cumplimiento parcial
de los requisitos para el grado de
Maestro en Ciencias
en Biología

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGUEZ
2010

Aprobado por:

Jaime Acosta, Ph. D Miembro del Comité Graduado	Fecha
Carlos J. Santos, Ph. D Miembro del Comité Graduado	Fecha
María M. Vargas, Ph. D Presidenta del Comité Graduado	Fecha
Nanette Diffoot Carlo, Ph. D Directora del Departamento de Biología	Fecha
Ernesto Riquelme, Ph. D Representante de Estudios Graduados	Fecha

ABSTRACT

Coprophilous fungi are saprophytic organisms that live on dung. A study on coprophilous fungi associated with the feces of laying hens of the Rhode Island breed, at two poultry farms located at Moca and Lajas, was conducted during high and low rainfall seasons. The feces of laying hens present serious risks of contamination because they generate unpleasant odors, promotes invasion of insects and are a potential substrate for pathogenic microorganisms. At each farm, eight fecal samples were taken; four during each study season. Each sample consisted of 5 g of hen dung placed in a dilution bottle with Phosphate Buffered Saline (PBS). The samples were centrifuged, filtered and inoculated into Saboraud Dextrose Agar (SDA), Brain-Heart Infusion Agar (BHIA) and Brain-Heart Infusion Agar supplemented with bovine blood (BHIA + blood) culture media. One hundred and sixty fungal colonies were identified, out of which 136 were yeasts and 24 were filamentous fungi. From the fungal colonies, 12 genera and 18 species were isolated: *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Aspergillus niger*, *A. versicolor*, *Penicillium frequentans*, *P. spinulosum*, *P. waksmani*, *Curvularia brachyspora*, *C. lunata*, *C. senegalensis*, *Nigrospora oryzae*, *Bipolaris spicifera*, *Gonabotrytis* sp., *Tripospermum* sp., *Coelomycete*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula* sp., *Candida famata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. albicans*, *C. ciferrii*, *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. This study ratifies that the feces of laying hens are an adequate organic substrate for several fungal species, some of which are pathogenic for humans.

RESUMEN

Los hongos coprófilos son organismos saprófitos que viven sobre excrementos. Se realizó un estudio sobre hongos coprófilos asociados a las heces de gallinas ponedoras de la raza Rhode Island, en dos granjas avícolas localizadas en Moca y en Lajas, en temporadas de alta y baja precipitación. Las heces de gallinas ponedoras presentan serios riesgos de contaminación debido a que generan olores desagradables, promueve la invasión de insectos y es el sustrato de microorganismos patógenos. En ambas granjas se realizaron ocho muestreos, cuatro en cada época de estudio. Cada muestra consistió de 5 g de heces que fueron colocados en una botella de dilución con amortiguador fosfato salino (PBS). Luego, las muestras se centrifugaron, filtraron e inocularon en los medios de cultivo de agar de dextrosa Saboraud (SDA), infusión de cerebro-corazón vacuno (BHIA) e infusión de cerebro-corazón vacuno suplementado con sangre (BHIA+blood). Se obtuvieron 160 colonias fúngicas, de las cuales 136 fueron levaduras y 24 hongos filamentosos. De las colonias de hongos, se aislaron 12 géneros y 18 especies: *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Aspergillus niger*, *A. versicolor*, *Penicillium frequentans*, *P. spinulosum*, *P. waksmani*, *Curvularia brachyspora*, *C. lunata*, *C. senegalensis*, *Nigrospora oryzae*, *Bipolaris spicifera*, *Gonabotrytis* sp., *Tripospermum* sp., *Coelomycete*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula* sp., *Candida famata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. albicans*, *C. ciferrii*, *Candida* sp. y *Cryptococcus* sp. Este estudio ratificó que las heces de gallinas ponedoras son un sustrato orgánico adecuado para varias especies fúngicas, entre las que se encuentran especies patógenas para el ser humano.

© Anadeliz Sánchez Román 2010

DEDICATORIA

Primero a Dios, por brindarme la sabiduría, la fortaleza y el conocimiento para lograr ésta importante meta en mi vida. A mi familia, mis abuelos Cristina González y Félix Román, y demás miembros, por siempre apoyarme. A mi hermana, Solymar Sánchez, por inculcarme que para alcanzar los sueños y las metas hay que luchar y perseverar. A mi madre y gran amiga, Ana D. Román, por creer en mí, por cuidarme en mi niñez y en mi juventud, y por convertirme en la mujer que soy.

AGREDECIMIENTO

Agradezco a los dueños de las granjas avícolas estudiadas por permitirme realizar los muestreos en sus facilidades. A mi comité graduado, el Dr. Jaime Acosta y el Dr. Carlos J. Santos, por el tiempo brindado para aclarar dudas, por compartir sus conocimientos conmigo y por sus sugerencias para realizar esta investigación. En especial, agradezco a mi consejera de tesis la Dra. María M. Vargas, no sólo por brindarme sus conocimientos, confiar en mí como estudiante y en mi aptitud para realizar la investigación, sino por confiar en mí como profesional y ser humano. A Carolyn Rivera, Magaly Zapata Lucca y Katherine Carrero, técnicas del laboratorio de micología, microbiología e inmunología, respectivamente, por prestarme equipo de laboratorio y/o ayudarme en la identificación de varios microorganismos. Al Sr. José R. Almodóvar Faria por su ayuda en el laboratorio de microscopía, y a los técnicos Juan Toro Casiano y Héctor Sepúlveda Ramírez, por sus gestiones para suministrarme algunos materiales.

Le agradezco al Departamento de Biología del Recinto Universitario de Mayagüez el brindarme las facilidades de laboratorio. Al alcalde de San Sebastián, el honorable Javier Jiménez, a la Cooperativa de Ahorro y Crédito Pepiniana, a la compañía de Jugos del Pepino, a Seguros Múltiples, a las industrias “Celestica” y “Symmetronic”, por su apoyo económico para la compra de materiales. Al Dr. Luis Cáceres, Decano Asociado de Investigación del RUM, por su colaboración en la obtención de materiales necesarios para la identificación de microorganismos.

Gracias a la Sra. Ana D. Román, por su ayuda en la toma de muestras, material fotográfico, transportación y localización de los lugares de muestreo. A los estudiantes

subgraduados Emanuel Sánchez, Krystal S. Irizarry, Michelle Medina y Letzibeth Méndez, por su ayuda en el procesamiento de muestras y preparación de material para esta investigación.

Agradezco a la Prof. Elba Iris Román, consejera de la Universidad de Puerto Rico en Aguadilla, por su ayuda en la corrección del escrito de la tesis. A la ingeniera Solymar Sánchez por sus sugerencias en la preparación de las cotizaciones de los materiales usados en esta investigación. También, deseo agradecer a mis compañeras de laboratorio Suheidy Valentín y Yesenia Echevarría, por sus consejos y apoyo, fundamentales para lograr culminar esta investigación.

Finalmente, quisiera agradecer a nuestro Señor Jesucristo, porque sin su ayuda no hubiese podido realizar este trabajo ni ninguno otro. También deseo expresar un profundo agradecimiento a mi familia, por apoyarme en todo momento y porque a través de una sonrisa o palabra de aliento me dieron día a día la fuerza para llegar al final.

TABLA DE CONTENIDO

Página

Abstract……...**II**

Resumen……....**III**

Dedicatoria……..……**V**

Agradecimientos……**VI**

Lista de Tablas……..…....**IX**

Lista de Figuras……....…...**X**

Lista de Apéndices…….……**XIII**

Introducción…….**1**

Revisión de Literatura……..**4**

Metodología……..…….**17**

Resultados……..**27**

Discusión……**61**

Conclusiones……..**72**

Recomendaciones……..**73**

Literatura Citada……**74**

Apéndices……...**85**

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Cantidad de colonias aisladas, por época y lugar de muestreo, en las heces de gallinas ponedoras……..**28**

Tabla 2. Cantidad de colonias aisladas, por mes y lugar de muestreo, en la época de baja precipitación, en las heces de gallinas ponedoras……..……..……..**28**

Tabla 3. Cantidad de colonias aisladas, por mes y lugar de muestreo, en la época de alta precipitación, en las heces de gallinas ponedoras…….……...……..**29**

Tabla 4. Frecuencia, por época y lugar de muestreo, de los géneros aislados en las heces de gallinas ponedoras……..**31**

Tabla 5. Frecuencia, por época y lugar de muestreo, de las especies aisladas en las heces de gallinas ponedoras……..**32**

Tabla 6. Promedio de las variables físico-químicas, por época y lugar de muestreo, analizados en las heces de las gallinas ponedoras……...**34**

Tabla 7. Promedio de las variables físico-químicas, por muestreo y lugar de estudio, analizados en la época de baja precipitación en las heces de las gallinas ponedoras……...**35**

Tabla 8. Promedio de las variables físico-químicas, por muestreo y lugar de estudio, analizados en la época de alta precipitación en las heces de las gallinas ponedoras……...**35**

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Localización de las áreas geográficas de muestreo: (A) Lajas, (B) Moca…….**17**

Figura 2. Dimensiones de los ranchos en las áreas de muestreo: (A) ancho del rancho en Lajas, (B) largo del rancho en Lajas, (C) largo y ancho del rancho en Moca……...…..**18**

Figura 3. Dimensiones del área de muestreo de la granja avícola en Moca: (A) dimensiones del área de estudio, (B) división del área en 15 cuadrantes y ejemplo de la obtención de una muestra en uno de los cinco cuadrantes seleccionados…….....**20**

Figura 4. Dimensiones del área de muestreo de la granja avícola en Lajas: (A) correas de plástico a muestrear, (B) dimensión del área a muestrear y (C) obtención de la muestra……....…..**21**

Figura 5. Características macroscópicas y microscópicas de *Aspergillus niger*: (A) anverso de la colonia en SDA, (B) anverso de la colonia en Czapek, (C) vesícula globosa (Nomarski-400X), (D) pie basal (Nomarski-400X), (E) conidióforo (Nomarski-200X) y (F) conidias (Nomarski-600X)……..……..…….…..**37**

Figura 6. Características macroscópicas y microscópicas de *Cladosporium cladosporioides*: (A) anverso de la colonia en SDA, (B) reverso de la colonia en SDA, (C) conidióforo (Nomarski-400X) y (D) conidias (Nomarski-400X)…….…**39**

Figura 7. Características macroscópicas y microscópicas de un *Coelomycete:* (A) anverso de la coloniaen SDA, (B) picnidios y reverso de la colonia en SDA, (C) picnidio (Nomarski-400X) y (D) conidias (Nomarski-400X)…….……..……....**40**

Figura 8. Características macroscópicas y microscópicas de *Nigrospora oryzae:* (A) anverso de la colonia en SDA, (B) reverso de la colonia en SDA, (C) conidias (Nomarski-400X) y (D) conidióforo (Nomarski-400X)……....…….....**42**

Figura 9. Características macroscópicas y microscópicas de *Bipolaris spicifera:* (A) anverso de la colonia en PDA, (B) conidias (Nomarski-400X), (C) hilo conidial (Campo claro-600X) y (D) conidióforo (Nomarski-400X)……...……..….**43**

Figura 10. Características macroscópicas y microscópicas de *Penicillium spinulosum:* (A) anverso de la colonia en SDA, (B) anverso de la colonia en Czapek, (C) conidióforo (Nomarski-400X), (D) ápice del conidióforo (Nomarski-400X) y (E) conidias (Nomarski-400X)……..…….……**45**

Figura 11. Características macroscópicas y microscópicas de *Tripospermum* sp.: (A) anverso de la colonia en OA, (B) surgimiento de conidias (Nomarski-400X), (C) y (D) formación de ramas conidiales (Nomarski-400X), (E) formación final de una conidia (Nomarski-400X) y (F) conidias (Nomarski-400X)…..…….…….……..**46**

Figura 12. Características macroscópicas y microscópicas de *Cladosporium sphaerospermum:* (A) anverso de la colonia en SDA, (B) reverso de la colonia en SDA, (C) conidióforo (Nomarski-400X) y (D) conidias (Nomarski-400X).……**48**

Figura 13. Características macroscópicas y microscópicas de *Curvularia brachyspora:* (A) anverso de la colonia en PDA, (B) reverso de la colonia en PDA, (C) conidióforo (Nomarski-400X) y (D) conidias (Nomarski-400X).……..…...……...**49**

Figura 14. Características macroscópicas y microscópicas de *Aspergillus versicolor:* (A) anverso de la colonia en PDA, (B) anverso de la colonia en Czapek, (C) vesícula (Nomarski-400X), (D) pie basal (Nomarski-400X), (E) conidióforo (Nomarski-200X) y (F) conidias (Nomarski-400X).……...…….……..**51**

Figura 15. Características macroscópicas y microscópicas de *Penicillium waksmani*: (A) anverso de la colonia en SDA, (B) anverso de la colonia en Czapek, (C) ápice del conidióforo (Nomarski-400X), (D) conidias (Nomarski-400X) y (E) conidióforo (Nomarski-400X)…….……..……...……**52**

Figura 16. Características macroscópicas y microscópicas de *Curvularia lunata*: (A) anverso de la colonia en PDA, (B) reverso de la colonia en PDA, (C) conidióforo (Nomarski-400X) y (D) conidias (Nomarski-400X)….…….…….**54**

Figura 17. Características macroscópicas y microscópicas de *Gonabotitrys* sp.: (A) anverso de la colonia en SDA, (B) conidióforo (Nomarski-400X), (C) células hinchadas del conidióforo (Nomarski-600X) y (D) conidias (Nomarski-400X).……...……..**55**

Figura 18. Características macroscópicas y microscópicas de *Penicillium frequentans*: (A) anverso de la colonia en PDA, (B) reverso de la colonia en PDA, (C) anverso de la colonia en Czapek, (D) conidias (Nomarski-400X), (E) conidióforo (Nomarski-400X) y (F) ápice del conidióforo (Nomarski-400X).…….**57**

Figura 19. Características macroscópicas y microscópicas de *Curvularia senegalensis*: (A) anverso de la colonia en PDA, (B) reverso de la colonia en PDA, (C) conidióforo (Nomarski-400X) y (D) conidias (Nomarski-400X)…….……..……..**58**

Figura 20. Características microscópicas de levaduras aisladas: (A) células y pseudohifas de *Candida ciferrii* (Campo claro-600X), (B) células y pseudohifas de *Candida parapsilosis* (Campo clar-600X), (C) células de *Rhodotorula mucilaginosa* (Campo claro-600X), (D) células de *Candida famata* (Campo claro-600X), (E) células y clamidiospora al final de la pseudohifa de *Candida albicans* (Campo claro-600X) y (F) células y pseudohifa de *Candida guillermondii* (Campo claro-600X)…….**59**

LISTA DE APÉNDICES

Página

Apéndice A Heces de gallinas ponedoras……..……**85**

Apéndice B Gallinas ponedoras *Rhode Island*……...**86**

Apéndice C Pruebas del Chi χ^2 para la presencia y diversidad de hongos por temporada y área de muestreo……**87**

Apéndice D Pruebas *t* independiente para las variables físico-químicas analizadas a las heces de gallinas ponedoras……..……...**95**

INTRODUCCIÓN

Las granjas avícolas en Puerto Rico son reguladas por el Departamento de Agricultura de Puerto Rico. Estas granjas son la segunda empresa agropecuaria de importancia económica en la Isla porque generan cerca de 90 millones de dólares anualmente. Las granjas avícolas de mayor demanda son las constituidas por los *pollos parilleros* y las *gallinas ponedoras*, representando el 70% de la producción avícola. Los pollos parilleros son los gallos y gallinas que son sacrificados para comercializar su carne, mientras que las gallinas ponedoras son las que se destinan a la producción de huevos. Estimados de la Sección de Estadísticas del Departamento de Agricultura indican que en el país hay alrededor de 1.6 millones de gallinas ponedoras y 8.3 millones de pollos parrilleros. Estos dos renglones de la granja avícola generan cada año miles de toneladas de excremento. Considerando una población de 1.6 millones de ponedoras, el estimado de producción anual de excremento fresco es de 61,760 toneladas, que corresponde a 15,360 toneladas de excremento seco. Este material presenta serios riesgos de contaminación debido a que genera olores desagradables, promueve la invasión de moscas, mosquitos y otros insectos pero, sobre todo, es el sustrato de varios microorganismos patógenos (Gilbertone *et al.*, 1979; O'Hallorans y Muñoz, 2006).

Científicos y estudiosos de la materia han señalado a los hongos como parte del grupo de microorganismos que pueden usar el excremento de gallina como sustrato. Entre éstos podemos encontrar hongos pertenecientes de los géneros *Cladosporium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula*, que también pueden encontrarse en sustratos orgánicos como el suelo y el agua, entre otros. Estos hongos crecen rápidamente, y pueden producir esporas y sustancias tóxicas perjudiciales a la salud. Estas sustancias tóxicas han causado

enfermedades infecciosas, irritación, reacciones alérgicas y desórdenes inmunológicos (Mangiarotti *et al.*, 1993; Richardson, 2001; Sáenz y Gutiérrez, 2006)

Los hongos que se alimentan de materia muerta o inerte, como la hojarasca, madera, cadáveres y excremento, se denominan como saprófitos o saprobios, palabra procedente del griego, en el que *sapros* significa podrido y *bios* significa vivo. Para diferenciar a los hongos que se alimentan del excremento del resto de los saprófitos, se designan a éstos como hongos coprófilos, palabra procedente del griego, en la que *copros* significa excremento y *filos* significa amigos (Chaumeton, 1987). Se han realizado varias investigaciones en las cuales se ha estudiado la presencia de hongos coprófilos asociados a excrementos de palomas (Calcedo *et al.*, 1996; Maldonado *et al.*, 2001; Quintero *et al.*, 2005; Curo *et al.*, 2005) y murciélagos (Aguirre, 1959; Taylor *et al.*, 1994; Chávez-Tapia *et al.*, 1998). En cambio, investigaciones dirigidas a conocer la micoflora asociada a heces de aves de corral, específicamente de gallinas, han sido muy escasas. Esto puede deberse al desconocimiento de la magnitud del problema y sus posibles consecuencias a la salud humana.

Hay que reconocer que las industrias de alimentos, como lo son las granjas avícolas, deben estar libres de posibles focos de contaminación para así evitar implicaciones en la salud de los trabajadores, en la de sus visitantes, en las de las mismas aves, y en la del consumidor al garantizar la calidad del producto. La acumulación de heces de aves y manejo inadecuado de éstas, puede presentar una situación perjudicial. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos declaró al excremento de los animales de granjas como desecho tóxico debido a que se ha manejado en forma incorrecta, convirtiéndose en un riesgo de contaminación por nitratos para los acuíferos (Florez-Margez *et al.*, 2002). Sin embargo, la aplicación apropiada

como abono orgánico en suelos agrícolas permite la disposición de los desechos, el reciclaje de nutrientes y la conservación del agua (Walker, 1999).

La investigación aquí presentada es de suma importancia porque los resultados que se obtengan pueden servir para verificar que las heces de gallinas ponedoras son un sustrato para algunos hongos patógenos como *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* y *Candida albicans* y demostrarán que estas aves, y su hábitat, tienen asociados hongos filamentosos y levaduriformes con capacidad nociva. Además, el conocer el hábitat de algunos hongos patógenos es una valiosa herramienta en el diagnóstico de diversas micosis. También los hallazgos encontrados ayudarán a concienciar que hay que establecer medidas asépticas y de control al trabajar en estos lugares y al manejar los desechos fecales generados. Por último, el identificar fuentes de infección a la que se puede exponer una persona, permite que éstas puedan ser controladas, transformadas o eliminadas, contribuyendo de esta manera a la salud humana.

Los objetivos de esta investigación fueron: 1) ratificar que las heces de gallinas ponedoras son un sustrato orgánico para hongos, 2) conocer la diversidad fúngica asociada en heces de gallinas ponedoras en épocas de alta y baja precipitación, 3) determinar si la presencia y diversidad fúngica se ven afectadas por la época y lugar de muestreo y 4) determinar si las variables físico-químicas (pH, temperatura y humedad) son similares en ambas épocas y lugares de muestreo.

REVISIÓN DE LITERATURA

Hongos

Los hongos son un grupo cosmopolita, por lo que están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se han descrito aproximadamente 500,000 especies, pero se estima que pueden existir entre 1 y 1.5 millones. Requieren de factores ambientales como *pH*, *humedad*, *temperatura*, *altitudes* y *sustratos orgánicos* para poder crecer y reproducirse. El rango en *pH* es de 2 a 9; pero, en general, los hongos filamentosos se adaptan más a ambientes ligeramente ácidos (pH de 5.0) y, para la mayoría, el pH óptimo es alrededor de 5.6. Las levaduras crecen mejor en ambientes neutros (pH de 7.0). La *humedad* debe ser superior a 55%, siendo de 60 a 80% donde la mayoría crece y fructifica mejor. Los límites de *temperatura* son entre 4 a 60 ºC presentando, la mayoría de las especies, sus intervalos entre 10 y 40 ºC, y oscilando entre los 20 y 30 ºC la temperatura óptima. Pueden habitar en una gama de *altitudes* que van desde el nivel del mar hasta por encima de los 4,000 m sobre el nivel del mar, y en *sustratos* que contienen fuentes de carbono orgánico e iones de amonio o nitrato como fuentes de nitrógeno (Herrera y Ulloa, 1990; Hawksworth, 1997; Bial, 2002).

Los organismos fúngicos son un componente vital en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas ya que desempeñan diversas funciones de tipo ecológico y fisiológico. Entre sus funciones principales se destacan las siguientes: son mediadores e integradores del desarrollo de poblaciones vegetales; a través del crecimiento de sus hifas modifican la permeabilidad y estructura del suelo; representan una fuente de alimento para vertebrados e invertebrados; son hábitat de invertebrados, algas y otros hongos; establecen asociaciones mutualistas con plantas (micorrizas), cianobacterias o algas (líquenes) y otros; son descomponedores (saprófitos) de

restos orgánicos, contribuyendo al reciclamiento y degradación de la materia (Herrera y Ulloa, 1990; Hawksworth, 1997; Hermosilla, 2000).

Hongos coprófilos

Se designan como hongos coprófilos al grupo de hongos saprófitos que viven sobre excrementos. Estos hongos se desarrollan sobre excrementos tanto de herbívoros como de carnívoros y omnívoros. Su distribución en el ambiente está influenciada por el tipo de vegetación, la presencia de animales, la clase de excremento y las condiciones climáticas (Lundqvist, 1972; Richardson, 1972; Wicklow y Moore, 1974). Lincoff (1981) indicó que los principales grupos son los Mucorales, Discomycetes y Basidiomycetes.

Los hongos coprófilos se dividen en tres grupos: a) estrictos, que se desarrollan solamente sobre excrementos; b) facultativos, que crecen sobre excrementos y otros tipos de sustratos; y, c) subcoprófilos, que no crecen directamente sobre los excrementos sino sobre terrenos entremezclados con éstos. Lundqvist (1972) sugiere que los hongos coprófilos pueden haber evolucionado a partir de hongos lignícolas y terrícolas. Según Webster (1970), el hábitat coprófilo está relacionado con animales de sangre caliente, característica que en la actualidad es presentada por aves y mamíferos, en cuyos excrementos es donde más especies coprófilas se desarrollan.

Los hongos coprófilos incluyen representantes de las divisiones Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota y del grupo Deuteromycota, teniendo lugar una sucesión de especies en el proceso de colonización y degradación de los excrementos, que ha sido estudiada por varios investigadores (Piontelli *et al.*, 2006). Harper y Webster (1964) intentaron explicar la sucesión, sugiriendo que cada especie requiere de un mínimo de tiempo para producir sus

cuerpos fructíferos. Webster (1970) postuló que la aparición secuencial tiene una base nutricional, esto es, que hay un orden en el que se van utilizando las diferentes fuentes nutricionales que están en el sustrato. Según esta secuencia nutricional, Webster establece que los primeros que llegarían serían los Mucorales porque sus esporas germinan rápidamente y degradarían los nutrientes más solubles como azúcares libres, proteínas y almidón; luego, los ascomycetos que degradarían la celulosa y, por último, los basidiomycetos que degradarían la lignina. Hudson (1978) propuso una sucesión similar a la de Webster, cuyo orden es Mucorales, Pezizales, Sphaeriales y Agaricales. Aunque el esquema de Hudson está bastante aceptado, algunos autores incluyen modificaciones como la aparición de hongos del grupo Deuteromycota entre los Mucorales y los Pezizales, y la aparición paralela de Agaricales y Pyrenomycetes. Rayner y Todd (1979) apoyaron la explicación inicial de Harper y Webster e indicaron que el tiempo que una especie está en el sustrato depende de su capacidad de coexistir y/o establecer asociaciones con otras especies fúngicas. Estudios más recientes realizados por Aguirre y Ulloa (1983) indicaron que los primeros hongos colonizadores son los Mucorales y que, cuando el carbono se encuentra en estructuras fácilmente biodegradables, mueren los Mucorales y aparecen los Ascomycota y Basidiomycota.

Ejemplos de hongos coprófilos

Las heces de numerosos animales, incluido el ser humano, son capaces de albergar un buen número de hongos coprófilos, entre los que se destacan: *Ascobolus roseopurpurascens*, *Bolbitius demangei*, *Coprinus pseudocortinatus*, *C. brevisetulosus*, *Fimaria ripensis*, *Hypocopra parvula*, *Podospora dakotensis*, *Poronia punctata*, *Psilocybe liniformans*, *P. merdicola*, *P. subviscida*, *P. fimetaria*, *Sporormiella australis*, *S. minima*, *Stropharia dorsipora* y *Thecotheus*

crustaceus (Rubio *et al*., 1999). Especies del género *Paneolus*, como *P. semiovatus* y *P. antillorum*, son hongos coprófilos cuyo crecimiento está ligado a altas condiciones de humedad (Guzmán y Pérez, 1972). *Gymnoascus reessii* (Eurotiomycetes, Onygenales, Gymnoascaceae) ha colonizado diferentes clases de heces y tipos de suelos ricos en materia orgánica en varias regiones geográficas (Currah, 1985; Domsch *et al.*, 1993; Delgado *et al.*, 2002). Hongos alucinógenos, como *Psilocybe cubensis*, habitan en excrementos de algunos rumiantes vacunos y de no vacunos. Los géneros de *Alternaria*, *Cladosporium* y *Aspergillus* tienen baja representación, y *Chaetomella acutiseta*, *Clonostachys rosea*, *Fusariella hughesii*, *Harzia verruscosa* y *Ochroconis tshawytschae* son raramente aislados de las heces (Richardson, 2001).

En los Ascomycota, orden Sordariales y familia Chaetomiaceae, está el género *Chaetomium* cuyas especies se han aislado de varios sustratos como remanentes de plantas, queratina, plumas, semillas, condimentos secos, textiles, papel, fibras de algodón, suelo y aire. Sin embargo, este género presenta mayor afinidad por sustratos con alto contenido de celulosa, por lo que es frecuente en excremento de herbívoros donde también hay nutrientes carbonatados y alto contenido de nitrógeno (Piontelli *et al*., 2006). Varias especies de este género son capaces de producir micosis oportunistas (De Hoog *et al*., 2000; Sigler y Verweij, 2003). Bajo el mismo orden se encuentra la familia Lasiosphaeriaceae en la que sobresalen dos géneros: *Schizothecium* y *Podospora*. El género *Podospora* tiene muchas especies y exhibe polimorfismo; la mayoría de sus especies son coprófilas y frecuentes colonizadores de diferentes deyecciones herbívoras, mientras que el resto habita en materia vegetal, semillas o suelo (Mirza y Cain, 1969; Lunqvist, 1972; Krug y Khan, 1989; Bell y Mahoney, 1995; Stchigel *et al.*, 2002; Bell, 2005). *Podospora perpexens* es un ejemplo de este género que además de ser coprófilo se ha aislado de suelo quemado en un bosque de *Nothofagus dombeyi* en la Patagonia Argentina (Lorenzo y

Havrylenko, 2002). En el género *Schizothecium* la mayoría de las especies son coprófilas y el resto habita en el suelo, plantas u otros sustratos (Piontelli *et al*., 2006).

En la familia Sordariaceae (Ascomycota) se encuentra el género *Sordaria* en el que todas sus especies son coprófilas y comunes en el suelo, semillas y detritos vegetales. En este género se destacan *S. fimicola*, *S. humana* y *S. macrospora*, especies cosmopolitas y bien comunes en el excremento de varios herbívoros (Lundqvist, 1972). La familia Sporomiaceae en los Ascomycota incluye géneros que son comúnmente encontrados en heces de varios animales pero también en el suelo, restos vegetales y en tejido humano (Burney *et al*., 2003). Bajo esta familia, el género *Sporomiella* es el más abundante en especies y la mayoría de sus miembros son coprófilos, los demás habitan sobre madera y suelo (Guarro *et al*., 1997; Barr, 2000). También se conoce el género *Preussia* cuyas especies se han aislado principalmente de desechos, madera, suelo y unas pocas en excremento (Piontelli *et al*., 2006).

En el orden Pezizales de la división Ascomycota sobresalen tres familias: Pezizaceae, Ascobolaceae y Ascodesmiaceae. En la familia Pezizaceae es notable *Iodophanus carneus* debido a que es un discomicete con distribución mundial y es uno de los más frecuentemente aislado en diferentes excrementos (Kimbrough *et al*., 1969; Kimbrough, 1982). En la familia Ascobolaceae se destacan como especies coprófilas los géneros *Ascobolus* y *Saccobolus* (Piontelli *et al*., 2006). En la familia Ascodesmiaceae se distingue el género *Lasiobolus*, el cual es uno de los discomicetes más frecuentemente aislados en excremento de rumiantes (Richardson, 1972).

Según Erikson (2006), en los Ascomycota, bajo la familia Thelebolaceae, están los géneros *Coprotus* y *Thelebolus*. El género *Coprotus* es esencialmente coprófilo y tiende a aparecer en el sustrato entre los 20 a 25 días. Un ejemplo de este género lo es *C. sexdecimporus*,

el cual no parece preferir un tipo de excremento en particular, y se aislado en deyecciones de caballo y vaca en Chile (Lazo, 1979; Piontelli *et al.*, 1981). El género *Theleobolus* se ha aislado de heces de mamíferos y aves en zonas templadas y frías (Gamundi *et al.*, 2004). Una especie de este género, *T. stercoreus*, se ha aislado de excremento de ganado, caballo y conejo silvestre en Chile (Piontelli y Grixolli, 1997; Piontelli *et al.*, 1981; 2006).

Según Rogers (1979), la familia Xylariaceae en los Ascomycota cuenta con hongos parásitos y saprófitos de angiospermas, y con representantes coprófilos. Un ejemplo de los coprófilos lo es *Xylaria equina* (San Martin *et al*., 1998).

En estudios palinológicos de excrementos fosilizados, se ha encontrado la presencia de esporas de hongos coprófilos como *Thecaphora*, *Gelasinospora* y *Chaetomium*, que han permitido conocer el origen fecal de estos sedimentos (Van Geel *et al.*, 1989). Incluso, la composición parcial o completamente fecal de algunos sedimentos puede ser deducida por el tipo de hongo coprófilo allí encontrado (Davis, 1987; Huffman y Dreyer, 2000).

Hongos coprófilos asociados a aves

Diverso estudios han revelado la presencia y aislamiento de levaduras en excretas de una variedad de especies de aves, como pericos, pollos, loros, gorriones así como en muestras de suelo (Littman y Borok, 1968; Bauwens *et al.*, 1986; Levitz, 1991). Un ejemplo de levaduras coprófilas es *Cryptococcus neoformans*, la cual tiene como reservorio principal el excremento de paloma (*Columbia livia*) y es una de las levaduras responsable de la infección micótica llamada criptococosis, afectando principalmente a personas inmunosuprimidas. Esta levadura también se ha aislado de la excreta de loros y gallinas, donde comparte el hábitat con *Rhodotorula* sp. y *Geotrichum* sp., porque aprovecha el ambiente salino, alcalino y rico en nitrógeno de estas heces

(Rippon, 1982). En un estudio de 251 muestras de heces de palomas, se encontraron 52 positivas (20.7%) a *C. neoformans* (Castañón-Olivares y López-Martínez, 1994). En otro estudio realizado al excremento de 74 aves, como pericos, patos y pavos, se aisló esta levadura en 9.45% de las muestras. También se dectectó su presencia en 16 de 149 muestras (9.46%) de diversas frutas, principalmente cítricos tales como limón, toronja, naranja y mandarina, así como en fresa y guayaba. En este mismo estudio se encontró presente en 20 de 468 muestras de diferentes verduras (4.2%) (López-Martínez y Castañón-Olivares, 1995). Otra levadura coprófila es *Cryptococcus gattii*, que también ocasiona criptococosis pero en personas inmunocompetentes, por lo que se puede suponer que es más virulenta, no obstante, la gravedad de la infección es la misma. Esta levadura puede encontrase en el excremento pero su principal hábitat son los detritos de los árboles de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) (Ellis y Pteiffer, 1990; Pteiffer y Ellis, 1991).

En países, como Colombia, se han realizado estudios que han demostrado la presencia de *C. neoformans* en heces de aves. Uno de los estudios fue en el área urbana de Medellín, donde se aisló a *C. neoformans* en el 18.8% de las muestras de excretas de palomas (Mira *et al*., 1968). En otro, Ordoñez y Castañeda (1994) informaron el hallazgo de *C. neoformans* en 28 (53.8%) de 52 muestras de excretas de palomas tomadas de distintas ciudades de Colombia. Obtuvieron 4 aislamientos en Bogotá, 5 en Cundinamarca, 8 en Cucutá y 11 en Cali. Otro estudio, realizado en el perímetro urbano de Cali, se demostró una amplia distribución y una cifra alta (49.6%) de aislamientos de *C. neoformans* en heces de palomas (Calcedo *et al*., 1996). En otro estudio realizado en el perímetro urbano de Ica en Perú, se analizaron 124 muestras procedentes de los suelos contaminados con excretas de palomas de los palomares de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga, Capilla del Hospital Socorro, Los viñedos de Santa

María, La Victoria y San Joaquín, y se aislaron 26 cepas del género *Cryptococcus* de las cuales 9 cepas correspondieron a *C. neoformans* y 17 a *Cryptococcus* sp. (Curo *et al*., 2005). En otro estudio, realizado en Cundinamarca (Colombia) se aisló e identificó a *C. neoformans* en varios reservorios; recuperándose con mayor frecuencia en excrementos de palomas por ser un sustrato con altos niveles de xantina, urea, ácido úrico y creatinina, compuestos que estimulan su crecimiento. Además, la levadura mostró una predilección por el piso térmico frío con temperaturas entre 12 y 18 ºC, dando a pensar que estas temperaturas son ambientalmente óptimas para aislarla en la naturaleza (Quintero *et al.*, 2005). Finalmente, el estudio de Quicaño *et al.* (1999), aisló a *C. neoformans* en heces y suelos contaminados con excretas de palomas, y también aisló una cepa a partir del ambiente aéreo, lo cual indica que las pequeñas formas celulares del hongo pueden ser fácilmente transportadas por el aire, ser inhaladas y alojadas en los alvéolos pulmonares por un hospedero humano, siendo por tanto las deyecciones de aves un importante reservorio natural.

En Venezuela se obtuvieron diversas especies de levaduras provenientes de 20 muestras de excretas de palomas tomadas en paredes y pisos de rampas de acceso de la fachada norte del centro hospitalario de la ciudad de Caracas. Las especies aisladas fueron del género *Cryprococcus*, tales como *C. uniguttulatus*, *C. laurentii* y *C. albidus*, y del género *Candida*, como *C. holmii*, *C. curvata*. *C. globosa*, *C. famata*, *C. norvegica* y *C. colliculosa.* También se aisló a *Saccharomyces kluyverii*, sin embargo no se logró aislar a *Cryptococcus neoformans* (Maldonado *et al*., 2001).

Otro hongo corpófilo es *Histoplasma capsulatum,* el cual es de alta virulencia y causante de la micosis sistémica llamada histoplasmosis. Este hongo se encuentra principalmente en el guano de los murciélagos, debido a que estas heces contienen abundantes sustancias

nitrogenadas, elemento necesario para la supervivencia de este hongo en la naturaleza (Taylor, 2000). También habita en las heces de aves, entre ellas las de gallinas, lo cual se comprueba al revelarse casos de histoplasmosis en personas que jamás han estado en sitios con guano de murciélago pero han efectuado limpiezas en corrales de gallinas y pavos. (Ajello, 1994). Varios estudios han identificado el suelo de lugares húmedos y sombríos como gallineros, y suelos contaminados con excrementos de pollos, patos, pavos, pájaros y murciélagos como reservorio de *H. capsulatum* (Elmer *et al*., 1993; Fitzpatrick y Hay, 1999). Una investigación realizada por Ulloa *et al*. (2006) determinó la micobiota presente en lugares catalogados como hábitat naturales de *H. capsulatum* como lo es el guano del murciélago, excretas de aves de corral como las gallinas y contenido intestinal de murciélagos. En las heces de aves se aisló el celomicete *Phoma* sp. y las levaduras *Candida albicans, C. catenulata, C. ciferrii, C. famata* var. *flareri, C. tropicalis, Cryptococcus albidus, Trichosporon moniliiforme* y *Trichosporon* sp.

En un estudio sobre hongos asociados al plumaje y excremento de gallinas realizado en la industria avícola de Monferrato en Italia, se reflejó la presencia de *Candida famata*, *C. guillermondii*, *Cryptococcus laurentii*, *Mucor hiemalis* y *M. reacemosus* en excrementos de aves sanas, mientras que en aves enfermas se presentó una mayor diversidad de hongos tales como *Aspergillus flavus*, *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *M. hiemalis*, *M. racemosus*, *C. albicans*, *C. pseudotropicalis* y *Cryptococcus laurentii*. *Cryptococcus neoformans* se aisló en baja frecuencia. El estudio determinó que estas aves y su hábitat están vinculados a hongos con capacidad toxicogénica o invasiva (Mangiarotti *et al.*, 1993).

Gallos y gallinas domésticas

Se utilizan dos nombres científicos para designar a los gallos y gallinas domésticas. *Gallus gallus*, el cual implica que fueron domesticados exclusivamente del gallo rojo de la jungla, y *Gallus domesticus*, el cual indica que más de una especie de gallos de la jungla contribuyó en la domesticación de estas aves. Existen cuatro especies de gallos de la jungla en el sureste de Asia: el gallo rojo (*G. gallus*), el gallo gris (*G. sonnerati*), el gallo Ceylon (*G. lafayettei*) y el gallo verde (*G. varius*) (Crawford, 1990). El gallo rojo de la jungla es la especie que más se parece a los gallos domésticos, puede que no sea su único ancestro pero sí el principal, lo que lleva a designar con mayor frecuencia a estas aves domésticas como *G. gallus* (Beebe, 1936; Johnsgard, 1986; Crawford, 1990). Incluso, estudios filogenéticos realizados por Fumhito *et al.* (1996) establecen que los gallos y gallinas domésticas se originaron de una población del gallo rojo de la jungla.

La domesticación de gallos y gallinas ocurrió aproximadamente 6,000 a 8,000 años atrás para propósitos de crianza y recreación. En los últimos 1,000 a 2,000 años se criaron para la producción de carnes y huevos (Limbery, 2002). La producción se mantuvo por mucho tiempo como medio de subsistencia familiar hasta después de la Primera Guerra Mundial, cuando surgió como industria comercial debido a un periodo de receso en la industria de cereales (Gómez, 1990).

Gallus gallus Linnaeus pertenece al Reino Animalia, Filo Chordata, Clase Aves, Orden Galliformes, Familia Phasianidae y Género *Gallus*. Se caracteriza por tamaño variable, cuerpo voluminoso, alas cortas, patas con cuatro dedos (tres de ellos dirigidos hacia delante y uno hacia atrás), y pico corto, robusto y con la punta encorvada (Gautier, 2002). Fueron introducidos a América durante los primeros viajes de Cristóbal Colón (1492 – 1493) hace más de 500 años

(Rosado, 1999). Su difusión se dio rápidamente como consecuencia de la adaptación de estos animales y la experiencia en la cría de aves (patos) por parte de los pueblos indígenas (Patiño, 1963).

Gallinas ponedoras

Las gallinas ponedoras son aves domésticas que tienen la capacidad genética para la producción de una gran cantidad de huevos de tamaños promedios y pesos uniformes. Existen dos tipos de empresas de gallinas ponedoras: *gallinas ponedoras de huevos fértiles* y *gallinas ponedoras de huevos comerciales*. Las ponedoras de huevos fértiles son las que durante su vida activa son mantenidas con gallos para producir huevos que se colocan en incubadoras y dan origen a más ponedoras, mientras que las ponedoras de huevos comerciales son las que ponen huevos no fértiles para consumo humano (Ortiz, 2000).

Las gallinas ponedoras comienzan su vida reproductiva a los cuatro a cinco meses y tienen una vida productiva hasta aproximadamente uno a dos años. Estadísticas de 1940 indicaban una producción de 134 huevos por gallina al año. Debido a manipulaciones genéticas y ambientales se ha logrado duplicar la producción y para el 2000 estaba en un promedio de 290 a 300 huevos por gallina al año. La población de estas aves en el mundo se estima en 4,700 millones y junto al pollo parillero se considera el ave más numerosa del planeta (Ortiz, 2000).

Existen diferentes razas de gallinas ponedoras según el lugar de origen. Entre ellas están las Leghorn que son aves pequeñas, productoras de huevos grandes y con una alta conversión alimento-postura. Las criollas son gallinas que han desarrollado una gran resistencia a condiciones ambientales desfavorables y su producción es modesta. Las Rhode Island y las New

Hampshire son aves tranquilas que se adaptan bien a los distintos climas y tienen una mayor resistencia a las enfermedades en comparación a las antes mencionadas (Ravner *et al.*, 2009).

Heces de gallinas como sustrato de microorganismos

Todos los materiales biológicos se pueden considerar como fertilizantes orgánicos, pero los fertilizantes más comúnmente usados en la agricultura son los desechos de animales de granja como gallinas, pavos, gansos, codornices, cerdos y vacas. Esto se debe a que son económicos, están fácilmente disponibles y tienen una gran diversidad de nutrientes. Son ricos en carbono, y contienen del 72 al 79% del nitrógeno y de 61 al 87% del fósforo del alimento original que se le proporciona (Taiganides, 1978).

Dentro de los desechos de animales las heces de gallinas son las preferidas como fertilizante porque su contenido de nutrientes es mayor que el de otros excrementos. Estudios en Puerto Rico y Estados Unidos revelan que las heces de gallinas contienen aproximadamente un 3% de nitrógeno (N), 2% de fósforo (P) y 2% de potasio (K). Además cuenta con otros nutrientes como el calcio (Ca), magnesio (Mg) y aluminio (Al) (O'Hallorans y Muñoz, 2006). Análisis químicos realizados por Sabban *et al.* (1968) revelaron una considerable cantidad de proteína bruta (31%), fibra (13-20%), calcio (0.9-8.8%), fósforo (1.6-2.5%), magnesio (0.4-0.9%), potasio (0.5-2.3%) y nitrógeno (0.5-2.3%). Estudios por Woynarovich (1979) reportaron una composición de 76% de humedad, 26% de materia orgánica, 1.6% de nitrógeno y 1.5% de fósforo; mientras que investigaciones de Schroeder (1980) mostraron una composición de 76% de humedad, 19% de materia orgánica, 1.1% de nitrógeno y 0.4% de fósforo. Por todos estos nutrientes, los desechos fecales de gallinas se han utilizado como alimento para el ganado vacuno (Smith y Wheeler, 1979). Incluso, la agencia norteamericana de la administración de

drogas y alimentos (FDA), emitió un decreto permitiendo el uso del excremento de gallina como fuente de alimento (Kirk, 1967). Las heces de gallinas, por su composición, son utilizadas como fertilizante, alimento vacuno, y sustrato de heterótrofos descomponedores como bacterias y hongos.

METODOLOGÍA

Áreas de muestreos

Las muestras de heces de gallinas ponedoras se obtuvieron de dos granjas avícolas. Una de ellas está localizada en el municipio de Lajas, al suroeste de Puerto Rico (Figura 1-A). Lajas se caracteriza por una temperatura promedio de 27 ºC y precipitación de 76.2 cm anual. La empresa tiene aproximadamente 20,000 gallinas distribuidas en jaulas apiladas en un rancho de 91 m de largo y 12 m de ancho (Figura 2-A, B). La segunda granja está localizada en el municipio de Moca al noroeste de Puerto Rico (Figura 1-B). Moca se caracteriza por una temperatura promedio de 24 ºC y precipitaciones de 152.4 a 203.2 cm anual. Esta granja tiene aproximadamente 26,000 gallinas en jaulas apiladas en un rancho de 91 m de largo y 13 m de ancho (Figura 2-C).

Figura 1. Localización de las áreas geográficas de muestreo:
(A) Lajas, (B) Moca (tomado de www.compraoalquila.com/ca_images/new2004/mapa-puerto-rico-regiones320.gif)

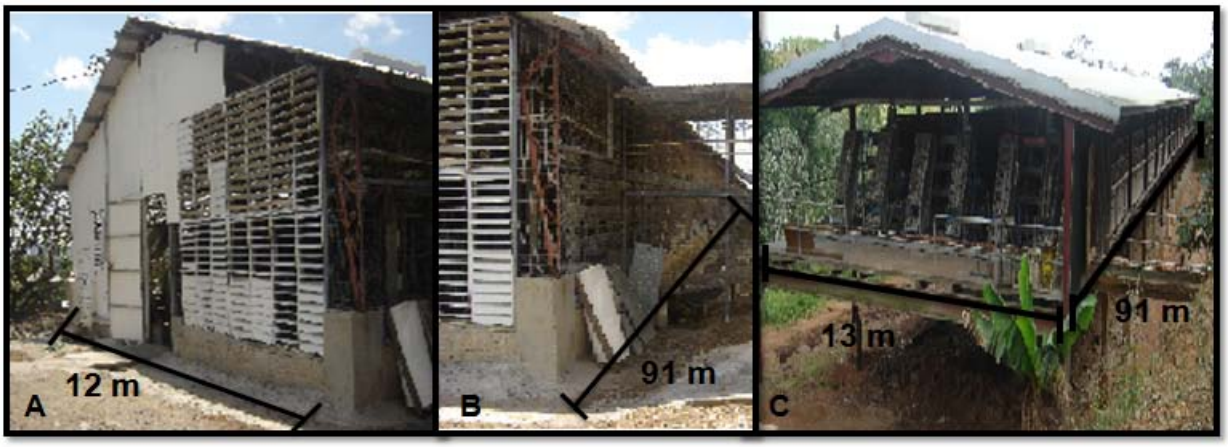

Figura 2. Dimensiones de los ranchos en las áreas de muestreo:
(A) ancho del rancho en Lajas, (B) largo del rancho en Lajas, (C) largo y ancho del rancho en Moca

Periodos de muestreo

A finales del 2007 y a comienzos y mediados del 2008 se realizaron ocho muestreos, cuatro en época de alta precipitación y cuatro en época de baja precipitación, en las dos granjas avícolas bajo estudio. Los meses correspondientes a la época de baja precipitación fueron diciembre (M1), enero (M2), febrero (M3) y marzo (M4); mientras que para la época de alta precipitación fueron mayo (M1.1), junio (M2.1), julio (M3.1) y agosto (M4.1). Los muestreos fueron mensuales.

Colección de muestras

En la granja de Moca las gallinas ponedoras están localizadas en hileras de jaulas en un rancho elevado (Figura 2-C). Sus heces caen desde sus jaulas y se acumulan en el suelo. Este suelo tiene una extensión de 75 m de largo por 12 m de ancho (Figura 3-A) y fue de donde se obtuvieron las muestras a analizar. En cada muestreo se dividió el área de estudio en quince cuadrantes de 15 m de largo por 4 m de ancho (Figura 3-B) y se seleccionaron al azar cinco de ellos. En cada cuadrante seleccionado se tomaron cinco porciones de excremento

(aproximadamente 5 g en cada porción) en puntos diferentes que luego se unieron para formar una muestra composta de 25 g (Figura 3-B).

En la granja de Lajas hay quince correas plásticas, localizadas debajo de las hileras de jaulas, para recoger las heces de las gallinas ponedoras (Figura 4-A). Estas correas se mueven acumulando el excremento en uno de sus extremos. Los extremos de las correas presentaron una extensión de 1 m de largo por 0.5 m de ancho (Figura 4-B) y fue el área de donde se obtuvieron las muestras a analizar. En cada muestreo se seleccionaron cinco correas plásticas al azar. En cada correa seleccionada, del extremo en que se acumula las heces, se tomaron cinco porciones de excremento (aproximadamente 5 g en cada porción) en puntos diferentes que luego se unieron para formar una muestra composta de 25 g (Figura 4-C).

Cada muestra se tomó usando cucharas estériles, con la finalidad de evitar la contaminación cruzada de las muestras, y fueron colocadas en bolsas plásticas estériles que se sellaron. Cada bolsa se rotuló indicando la fecha, cuadrante o correa muestreada y lugar de recolección. Luego fueron transportadas al laboratorio para ser procesadas.

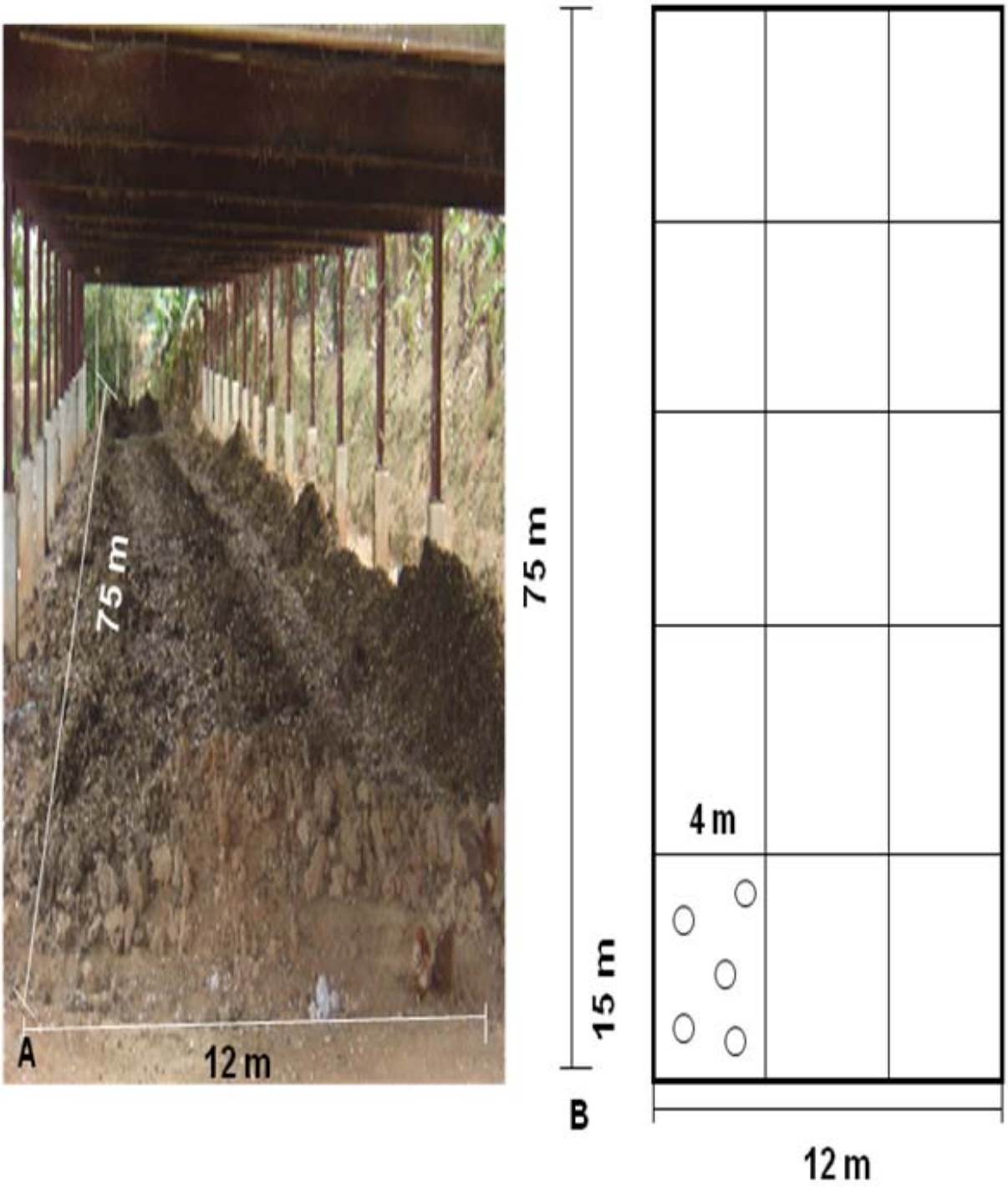

Figura 3. Dimensiones del área de muestreo de la granja avícola en Moca:
(A) dimensiones del área de estudio y (B) división del área de estudio en 15 cuadrantes y ejemplo de la obtención de una muestra en uno de los cinco cuadrantes seleccionados

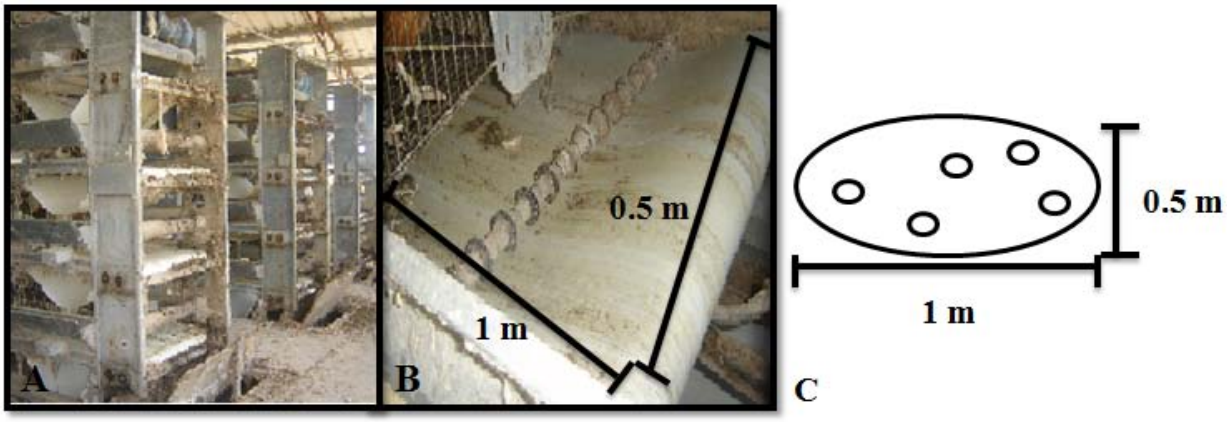

Figura 4. Dimensiones del área de muestreo en la granja avícola en Lajas:
(A) correas de plástico a muestrear , (B) dimensión del área a muestrear y (C) obtención de la muestra

Procesamiento de muestras

Se pesaron 5 gramos de cada muestra composta. Estos gramos fueron colocados en un mortero para fraccionarlos. Una vez fraccionados se añadieron a una botella de dilución que contenía 25 mL de amortiguador fosfato salino (PBS) y se agitaron vigorosamente por 10 minutos en un agitador magnético ("stirrer"). Luego se pasaron a un tubo de centrífuga de 25 mL en los que se centrifugaron por 5 minutos a 3,800 rpm y con la temperatura promedio (27 a 35 °C) presentada por las heces de gallinas en el muestreo. Posteriormente, para eliminar partículas en el sobrenadante resultante de la centrifugación, se filtraron usando un embudo y papel de filtro, hacia un tubo de ensayo. Al extracto obtenido se le añadieron 50 µl de una solución de antibióticos (0.33 g de los antibióticos estreptomicina, cloranfenicol y penicilina en 100 mL de agua estéril) para evitar el crecimiento de bacterias. Del extracto se hicieron diluciones en serie (1/10) con PBS, para disminuir la carga fúngica. De la dilución 10^{-6} se sacaron 100 µl en duplicado y se inocularon en platos Petri (100 x 15 mm) con los siguientes medios: agar de dextrosa según Saboraud (SDA, por sus siglas en inglés; 65 g/1000 mL agua destilada), agar de

infusión de cerebro y corazón (BHIA, por sus siglas en inglés; 52 g/1000 mL agua destilada) y agar de infusión de cerebro y corazón suplementado con sangre vacuna (BHIA+blood, por sus siglas en inglés; 52 g/1000 mL agua destilada, luego de esterilizar añadir 7 mL de sangre estéril/100 mL de medio). La inoculación se hizo a partir de la dilución 10^{-6} porque era la que permitiría obtener colonias discretas que luego pudieran ser aisladas e identificadas. Todos los platos inoculados fueron rotulados, sellados con parafina e incubados en forma invertida por 2 a 10 días a la temperatura promedio (27 a 35 °C) presentada por las heces fde gallinas en el muestreo. Se observaron los platos diariamente para detectar la presencia de colonias fúngicas.

Durante el proceso se usaron controles de calidad. Los controles fueron platos de cultivo con los mismos medios con los que se trabajó para la aislación fúngica de las heces. Unos se colocaron abiertos para detectar hongos contaminantes en el área de recolección y aislación, y otros cerrados para determinar si los medios de cultivo a usarse estaban contaminados. Se incubaron en forma invertida por 10 días a la temperatura promedio (27 a 35 °C) presentada por las heces de gallinas en el muestreo.

Variables físico-químicas analizadas en las heces de gallinas ponedoras

La humedad se determinó pesando 4 g de heces y colocándolas en un crisol previamente pesado y limpio. Posteriormente se colocó el crisol con la muestra en un horno seco a 110 ºC por un periodo de 24 horas. Finalmente se dejó enfriar en un desecador y por diferencia de peso se determinó la humedad de la muestra (Brissio, 2005). La fórmula para determinar la humedad fue la siguiente:

$$\% H = \frac{a - b}{b - c} (100)$$

- a = masa en gramos de la muestra más el crisol antes de ser colocado a 110 ºC
- b = masa en gramos de la muestra más el crisol después de ser colocado a 110 ºC
- c = masa en gamos del crisol

Para determinar el pH se pesó 1 g de heces que luego se colocó en 10 mL de una solución de $CaCl_2$ (0.01M). Se agitó durante 10 minutos a 100 rpm y a la temperatura promedio (27 a 35 °C) presentada por las heces de gallinas en el muestreo en un agitador ("shaker"). Luego, usando un potenciómetro para líquidos, se hizo la lectura directamente sobre el sobrenadante (Shiner *et al.*, 1996). La temperatura se obtuvo usando un termómetro de suelo que se introdujo en el excremento de gallina del cuadrante y correa antes de colectar la muestra.

Identificación de los hongos miceliales o filamentosos recuperados

Las colonias obtenidas en los cultivos primarios fueron sub-cultivadas en platos Petri (100 x 15 mm) con SDA, para generar cultivos puros (cultivo con una sola colonia fúngica), y se incubaron a 25 °C por 7 a 10 días o hasta un máximo de un mes. Se usó SDA para los cultivos puros porque fue en el único medio primario en que se recuperaron hongos filamentosos. Una vez obtenido el cultivo puro de la colonias, éstas se caracterizaron macroscópicamente (color anverso y reverso, forma, textura, margen y presencia de exudados). Para observar sus estructuras microscópicas como la morfología, tamaño, tipo de hifa, pigmentación, estructuras de reproducción asexual, organización y forma de las esporas, se realizaron cámaras húmedas (Riddell, 1950), las cuales se incubaron a 25 °C por 7 días. Si luego del periodo de incubación las cámaras carecieron de crecimiento abundante, éstas se dejaron por 7 días adicionales. Una vez culminado el periodo de incubación, se removieron los cubreobjetos, se colocaron sobre

laminillas con una gota de lactofenol y se sellaron con esmalte transparente para preservar las preparaciones (Kern y Blevins, 1997). Toda la caracterización microscópica se obtuvo a través de laminillas de cámaras húmedas y laminillas de preparaciones permanentes.

Para promover la esporulación de algunos hongos, éstos se transfirieron a otros medios de cultivo: agar de avena (OA, por sus siglas en inglés; 72.5 g/1000 mL agua destilada), agar de papa y dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés, 39 g/1000 mL agua destilada), agar de extracto de malta (MEA, por sus siglas en inglés; 33.6 g/1,000 mL agua destilada) y agar de harina de maíz (CMA, por sus siglas en inglés; 17 g/1000 mL agua destilada). Para la identificación de especies de *Penicillium* y *Aspergillus* se usó el agar de extracto de levadura Czapek (CYA, por sus siglas en inglés; 49 g/1000 mL agua destilada), según Gilman (1966). En algunos casos fue necesario hacer nuevamente cámaras húmedas utilizando los medios de cultivo que promueven la esporulación. Las colonias en los diferentes medios de cultivo fueron fotografiadas con una cámara digital.

Identificación de las levaduras recuperadas

Las colonias levaduriformes obtenidas de los cultivos primarios también fueron sub-cultivadas en los medios BHIA, BHIA+blood y SDA, para generar cultivos puros, y se incubaron a 25 °C por 2 días. El medio de cultivo al cual se transfirió cada colonia levaduriforme era igual al cultivo primario en la que se aisló. Para lograr la identificación de las levaduras se hicieron API 20C AUX (“Analytical Profile Index”) los cuales se complementaron con pruebas convencionales como la de temperatura, ureasa, “Niger Seed Agar”, “Chromagar” y “Biggy Agar”. Además se cultivaron en agar de maíz (CMA) para observar la forma de sus células y la presencia de pseudohifas y/o clamidiosporas.

Microscopía

Para facilitar la identificación microscópica se usaron varios microscopios disponibles en el laboratorio de investigación y en el Centro de Microscopía del Departamento de Biología, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Con la ayuda del microscopio compuesto de luz (Olympus) y microscopio compuesto equipado con óptica Nomarski (Olympus BH-2) se midieron y documentaron características morfológicas de los aislados.

Claves taxonómicas

Para la identificación de los hongos miceliales se usaron diversas claves taxonómicas. La identificación a nivel de género se hizo de acuerdo a la clave de Barnett y Hunter (1998). Para lograr la identificación a nivel de especie se usaron claves específicas: *Penicillium* y *Aspergillus* (Gilman, 1966), *Curvularia* (Sivanesan, 1987), *Bipolaris* (Mena, 2004) *Cladosporium* y *Nigrospora* (Domsch *et al*., 1993).

Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico se realizó con el programa Infostat versión 2009. Se realizaron *pruebas de t independiente,* con un nivel de confianza de 95%, para determinar si los promedios de las variables físico-químicas (pH, temperatura y humedad) analizadas en las heces de gallinas difieren en las temporadas (baja y alta precipitación) y lugares de muestreo (Moca y Lajas). Para determinar si la presencia y la diversidad de hongos es afectada por la temporada y área de muestreo se realizó la prueba de Chi χ^2 a un nivel de confianza del 95%. Se calculó la frecuencia de los hongos en cada área (número de veces que se aisló el hongo / total de hongos aislados por

área) y temporada de estudio (número de veces que se aisló el hongo / total de hongos aislados por temporada de estudio).

RESULTADOS

Hongos coprófilos recuperados

En los ocho muestreos realizados se aislaron 160 colonias fúngicas, 92 fueron aisladas en la granja avícola de Moca y 68 en la de Lajas. De éstas, 136 fueron levaduras y 24 hongos filamentosos o miceliales. Cuarenta y ocho fueron obtenidas en la época de baja precipitación y 112 en la época de alta precipitación. En ambas épocas y granjas avícolas el tipo de colonia que más se aisló fue la de levadura. En la Tabla 1 se presenta la cantidad de colonias fúngicas aisladas por época y lugar de muestreo. El estadístico del Chi χ^2 mostró, que tanto para la granja avícola de Moca ($p = 0.15$) como la de Lajas ($p = 0.16$), la presencia de hongos no fue afectada por la temporada de muestreo.

Para la época de baja precipitación, el M2 fue donde se aisló la mayor cantidad de colonias y en el M4 fue donde se aisló menos. La Tabla 2 muestra la cantidad de colonias aisladas por lugar y muestreos correspondientes a la época de baja precipitación. La prueba del Chi χ^2 mostró que la presencia de hongos para la época de baja precipitación no fue afectada por el área de muestreo ($p = 0.75$). Para la época de alta precipitación, el M1.1 fue donde se aisló la mayor cantidad de colonias y en el M4.1 fue donde se aisló menos. La Tabla 3 muestra la cantidad de colonias aisladas por lugar y muestreos correspondientes a la época de alta precipitación. La prueba del Chi χ^2 mostró que la presencia de hongos para la época de alta precipitación no fue afectada por el área de muestreo ($p = 0.52$).

El estadístico del Chi χ^2 mostró que la presencia de hongos no fue afectada por la época ($p = 0.11$) y área de muestreo ($p = 0.68$).

Tabla 1. Cantidad de colonias aisladas, por época y lugar de muestreo, en las heces de gallinas ponedoras.

Época	Tipo de colonia	Granjas Avícolas	
		Moca	**Lajas**
Baja precipitación	Levaduras	22	16
	Filamentosos	9	1
	Total	**31**	**17**
Alta precipitación	Levaduras	51	47
	Filamentosos	10	4
	Total	**61**	**51**

*Se aislaron 160 colonias fúngicas, 92 fueron aisladas en la granja avícola de Moca y 68 en la de Lajas, 136 fueron levaduras y 24 hongos filamentosos, y 48 fueron obtenidas en la época de baja precipitación y 112 en la época de alta precipitación.

Tabla 2. Cantidad de colonias aisladas, por mes y lugar de muestreo en la época de baja precipitación, en las heces de gallinas ponedoras.

Muestreos	Tipo de colonia	Granjas Avícolas	
		Moca	**Lajas**
M1	Levaduras	6	3
	Filamentosos	2	0
	Total	**8**	**3**
M2	Levaduras	5	5
	Filamentosos	5	1
	Total	**10**	**6**
M3	Levaduras	8	4
	Filamentosos	1	0
	Total	**9**	**4**
M4	Levaduras	3	4
	Filamentosos	1	0
	Total	**4**	**4**

*Se aislaron 48 colonias fúngicas, 31 fueron aisladas en la granja avícola de Moca y 17 en la de Lajas, 38 fueron levaduras y 10 hongos filamentosos. En el M2 fue donde se aisló la mayor cantidad de colonias y en el M4 fue donde se aisló menos.

Tabla 3. Cantidad de colonias aisladas, por mes y lugar de muestreo en la época de alta precipitación, en las heces de gallinas ponedoras.

Muestreos	Tipo de colonia	Granjas Avícolas	
		Moca	**Lajas**
M1.1	Levaduras	24	21
	Filamentosos	7	3
	Total	**31**	**24**
M2.1	Levaduras	11	9
	Filamentosos	1	0
	Total	**12**	**9**
M3.1	Levaduras	11	7
	Filamentosos	1	1
	Total	**12**	**8**
M4.1	Levaduras	5	10
	Filamentosos	1	0
	Total	**6**	**10**

*Se aislaron 112 colonias fúngicas, 61 fueron aisladas en la granja avícola de Moca y 51 en la de Lajas, 98 fueron levaduras y 14 hongos filamentosos. En el M1.1 fue donde se aisló la mayor cantidad de colonias y en el M4.1 fue donde se aisló menos.

Se identificaron 12 géneros y la frecuencia de éstos se resume en la Tabla 4. El género que más se aisló, en ambas granjas avícolas y en ambas épocas de estudio, fue *Candida* sp. En menor frecuencia se aisló a *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Curvularia* sp., *Penicillium* sp., *Tripospermum* sp., *Gonabotrytis* sp., *Nigrospora* sp., *Bipolaris* sp., *Rhodotorula* sp., *Cryptococcus* sp., y un *Coelomycete* en la granja avícola de Moca y *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Tripospermum* sp., *Rhodotorula* sp. y *Cryptococcus* sp. en la granja avícola de Lajas. La prueba del Chi χ^2 mostró, que tanto para la granja avícola de Moca ($p = 0.66$) como la de Lajas ($p = 0.48$), la diversidad de hongos no fue afectada por la época de muestreo. Con relación a la temporada de muestreo, para la época de baja precipitación se obtuvo en menor frecuencia a *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Penicillium* sp., *Tripospermum* sp., *Gonabotryris* sp., *Rhodotorula* sp. y *Cryptococcus* sp., mientras que para la época de alta precipitación fueron

Cladosporium sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Tripospermum* sp., *Nigrospora* sp., *Bipolaris* sp., *Rhodotorula* sp., *Cryptococcus* sp. y un *Coelomycete*. La prueba del Chi χ^2 mostró, que tanto para la época de baja precipitación (p = 0.85) como para la de alta precipitación (p = 0.94), la diversidad de hongos no fue afectada por el lugar de muestreo.

Las muestras obtenidas en Moca y en la época de alta precipitación presentaron más diversidad de géneros fúngicos que las obtenidas en Lajas y en la época de baja precipitación. Sin embargo, el estadístico Chi χ^2 mostró que la diversidad de hongos no fue afectada por la época (p = 0.76) y área de muestreo. (p = 0.99).

Dentro del género *Cladosporium* se identificaron dos especies, *C. cladosporioides* y *C. sphaerospermum*, en el género *Aspergillus* se identificaron dos, *A. niger* y *A. versicolor*, en el género *Penicllium* se identificaron tres, *P. frequentans*, *P. spinulosum* y *P. waksmani*, en el género *Curvularia* se identificaron tres, *C. brachyspora*, *C. lunata* y *C. senegalensis*, y en el género *Candida* fueron cinco, *C. famata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. albicans* y *C. ciferrii*. La frecuencia de las especies se resume en la Tabla 5.

Las especies *C. sphaerospermum*, *A. niger*, *A. versicolor*, *P. frequentans*, *P. spinulosum*, *C. brachyspora*, *C. lunata*, *C. senegalensis*, *Nigrospora oryzae*, *Bipolaris spicifera*, *Gonabotrytis*, el *Coelomycete* y *C. albicans* sólo se aislaron en la granja avícola de Moca, mientras que *P. waksmani* sólo se aisló en la granja avícola de Lajas. En cambio, *C. cladosporioides*, *Tripospermum sp.*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula sp.*, *C. famata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. ciferrii*, *Candida* sp. y *Cryptococcus* sp. estuvieron presentes en ambas granjas de estudio.

Los hongos *P. spinulosum*, *C. brachyspora*, *C. lunata*, *C. senegalensis* y *Gonabotrytis* sp. sólo se aislaron en la época de baja precipitación, mientras que *C. cladosporioides*, *A. niger*, *A.*

versicolor, P. frequentans, P. waksmani, N. oryzae, B. spicifera, el *Coelomycete, Rhodotorula* sp., *C. famata, C. guilliermondii* y *C. albicans* sólo se aislaron en la época de alta precipitación. En cambio, *C. sphaerospermum, Tripospermum* sp., *R. mucilaginosa, C. parapsilosis, C. ciferrii, Candida* sp. y *Cryptococcus* sp. se aislaron en ambas épocas de estudio.

Tabla 4. Frecuencia, por época y lugar de muestreo, de los géneros aislados en las heces de gallinas ponedoras.

Género	**Frecuencia**				
	Granjas Avícolas		**Época**		
	Moca	**Lajas**	**Baja precipitación**	**Alta precipitación**	**Total**
Cladosporium sp.	0.04	0.01	0.04	0.03	**0.12**
Aspergillus sp.	0.02	0.00	0.00	0.02	**0.04**
Curvularia sp.	0.03	0.00	0.06	0.00	**0.09**
Penicillium sp.	0.02	0.01	0.02	0.02	**0.07**
Tripospermum sp.	0.03	0.01	0.06	0.01	**0.11**
Gonabotrytis sp.	0.01	0.00	0.02	0.00	**0.03**
Nigrospora sp.	0.01	0.00	0.00	0.01	**0.02**
Bipolaris sp.	0.01	0.00	0.00	0.01	**0.02**
Coelomycete	0.01	0.00	0.00	0.01	**0.02**
Rhodotorula sp.	0.17	0.09	0.02	0.18	**0.46**
Candida sp.	0.63	0.81	0.76	0.65	**2.85**
Cryptococcus sp.	0.01	0.04	0.02	0.03	**0.10**
Estéril	0.01	0.03	0.00	0.03	**0.07**
Total	**1.00**	**1.00**	**1.00**	**1.00**	

* El género que más se aisló en ambas granjas avícolas y en ambas épocas de estudio fue *Candida* sp.

Tabla 5. Frecuencia, por época y lugar de muestreo, de las especies aisladas en las heces de gallinas ponedoras

Especies	Frecuencia				
	Granjas Avícolas		Época		
	Moca	Lajas	Baja precipitación	Alta precipitación	Total
Cladosporium cladosporioides	0.01	0.01	0.00	0.02	**0.04**
Cladosporium sphaerospermum	0.03	0.00	0.04	0.01	**0.08**
Aspergillus niger	0.01	0.00	0.00	0.01	**0.02**
Aspergillus versicolor	0.01	0.00	0.00	0.01	**0.02**
Penicillium frequentans	0.01	0.00	0.00	0.01	**0.02**
Penicillium spinulosum	0.01	0.00	0.02	0.00	**0.03**
Penicillium waksmani	0.00	0.01	0.00	0.01	**0.02**
Curvularia brachyspora	0.01	0.00	0.02	0.00	**0.03**
Curvularia lunata	0.01	0.00	0.02	0.00	**0.03**
Curvularia senegalensis	0.01	0.00	0.02	0.00	**0.03**
Nigrospora oryzae	0.01	0.00	0.00	0.01	**0.02**
Bipolaris spicifera	0.01	0.00	0.00	0.01	**0.02**
Gonabotrytis sp.	0.01	0.00	0.02	0.00	**0.03**
Tripospermum sp.	0.03	0.01	0.06	0.01	**0.11**
Coelomycete	0.01	0.00	0.00	0.01	**0.02**
Rhodotorula mucilaginosa	0.16	0.08	0.02	0.16	**0.42**
Rhodotortula sp.	0.01	0.01	0.00	0.02	**0.04**
Candida famata	0.04	0.01	0.00	0.04	**0.09**
Candida parapsilosis	0.11	0.10	0.11	0.09	**0.41**
Candida guilliermondii	0.01	0.01	0.00	0.02	**0.04**
Candida albicans	0.04	0.00	0.00	0.04	**0.08**
Candida ciferrii	0.02	0.04	0.08	0.01	**0.15**
Candida sp.	0.41	0.65	0.57	0.45	**2.08**
Cryptococcus sp.	0.01	0.04	0.02	0.03	**0.10**
Estéril	0.01	0.03	0.00	0.03	**0.07**
Total	**1.00**	**1.00**	**1.00**	**1.00**	

* La granja en Moca y la época de alta precipitación presentaron más diversidad fúngica que la granja en Lajas y la época de baja precipitación.

Variables físico-químicas analizadas en las heces de gallinas ponedoras

Se determinaron tres variables físico-químicas a las heces de las gallinas ponedoras: *pH*, *temperatura* (°C) y *humedad*. Los resultados de éstos se resumen en la Tabla 6. En la época de baja precipitación el pH fue ligeramente alcalino. En el M2 fue donde se reportó la más baja temperatura y la mayor humedad, mientras que en el M4 se reportó lo contrario, la más alta temperatura y la menor humedad (Tabla 7). Para la época de alta precipitación el pH también fue ligeramente alcalino. En el M1.1 fue donde se reportó la más baja temperatura y la mayor humedad, mientras que en el M4.1 se reportó lo contrario, la más alta temperatura y la menor humedad (Tabla 8).

En ambas épocas del año y en las dos granjas de estudio se presentaron pH ligeramente alcalinos. La prueba de *t* mostró que tanto en la granja avícola de Moca ($p = 0.76$) como en la de Lajas ($p = 0.07$) el promedio del pH fue igual en las dos épocas de muestreo. Este mismo estadístico presentó que tanto para la época de alta precipitación ($p = 0.80$) como para la de baja precipitación ($p = 0.40$) los pH fueron iguales en ambas granjas de estudio. En conclusión, el promedio del pH en las heces de las gallinas fue igual en las épocas de estudio ($p = 0.08$) y en las granjas muestreadas ($p = 0.33$).

Las temperaturas estuvieron entre los 27 a 35 °C, y fueron más altas en la época de mayor precipitación y en la granja avícola de Lajas. La prueba de *t* mostró que tanto en la granja avícola de Moca ($p < 0.0001$) como en la de Lajas ($p = 0.0001$) el promedio de la temperatura difirió en las dos épocas de muestreo. Este mismo estadístico reflejó que para ambas épocas de muestreo, alta precipitación ($p = 0.0002$) y baja precipitación ($p = 0.03$), el promedio de la temperatura fue distinto en las dos granjas de estudio. Concluyendo así, que el promedio de la

temperatura en el excremento de las gallinas es diferente en las dos épocas de estudio ($p < 0.0001$) y en los dos lugares de muestreo ($p = 0.0016$).

La humedad estuvo sobre 55% en ambas épocas y granjas de estudio. La mayor humedad se presentó en la época de alta precipitación y en la granja avícola de Moca. El estadístico de *t* mostró que tanto en la granja avícola de Moca ($p < 0.0001$) como en la de Lajas ($p < 0.0001$) el promedio de la humedad difirió en las dos épocas de muestreo. De igual manera el estadístico reflejó que para ambas épocas de muestreo, alta precipitación ($p < 0.0001$) y baja precipitación ($p = 0.0005$), el promedio de la humedad fue distinto en las dos granjas de estudio. En conclusión, el promedio de la humedad en las heces de las gallinas es diferente en las dos épocas de estudio ($p < 0.0001$) y en las dos áreas de muestreo ($p < 0.0001$).

Tabla 6. Promedio de las variables físico-químicas, por época y lugar de muestreo, analizadas en las heces de las gallinas ponedoras

Época	**Variables físico-químicas**	**Granjas Avícolas**	
		Moca	**Lajas**
Baja precipitación	Temperatura (°C)	29	31
	Humedad (%)	62	56
	pH	7.8	8.0
Alta precipitación	Temperatura (°C)	32	33
	Humedad (%)	73	64
	pH	7.8	7.8

*En ambas épocas del año y en las dos granjas de estudio se presentaron pH ligeramente alcalinos. Las temperaturas fueron más altas en la época de alta precipitación y en la granja avícola de Lajas. La mayor humedad se presentó en la época de alta precipitación y en la granja avícola de Moca.

Tabla 7. Promedio de las variables físico-químicas, por muestreo y lugar de estudio, analizadas en la época de baja precipitación en las heces de las gallinas ponedoras.

Muestreos	Variables físico-químicas	Granjas Avícolas	
		Moca	Lajas
M1	Temperatura (°C)	30	32
	Humedad (%)	61	55
	pH	8.5	8.5
M2	Temperatura (°C)	27	28
	Humedad (%)	66	57
	pH	7.5	7.7
M3	Temperatura (°C)	29	30
	Humedad (%)	63	56
	pH	7.7	8.1
M4	Temperatura (°C)	31	33
	Humedad (%)	60	55
	pH	8.3	7.8

* Los pH fueron ligeramente alcalinos para ambas granjas. La granja en Moca presentó mayor humedad y la granja en Lajas presentó más alta la temperatura.

Tabla 8. Promedio de las variables físico-químicas, por muestreo y lugar de estudio, analizadas en la época de alta precipitación en las heces de las gallinas ponedoras.

Muestreos	Variables físico-químicas	Granjas Avícolas	
		Moca	Lajas
M1.1	Temperatura (°C)	30	32
	Humedad (%)	80	66
	pH	7.6	7.7
M2.1	Temperatura (°C)	32	34
	Humedad (%)	72	62
	pH	7.7	7.7
M3.1	Temperatura (°C)	32	34
	Humedad (%)	74	65
	pH	7.9	8.1
M4.1	Temperatura (°C)	33	35
	Humedad (%)	68	62
	pH	7.9	7.8

* Los pH fueron ligeramente alcalinos para ambas granjas. La granja en Moca presentó mayor humedad y la granja en Lajas presentó más alta la temperatura.

Características de los hongos coprófilos aislados

La identificación de las especies de los hongos coprófilos aislados se llevó a cabo utilizando las claves taxonómicas y métodos previamente mencionados. Hubo hongos filamentosos que, a pesar de que se inocularon en varios medios para estimular su esporulación, no presentaron estructuras reproductivas por lo que se reportaron como hongos estériles. Aquellos hongos coprófilos que no coincidieron con las características descritas en las claves para su identificación hasta especie, fueron nombrados solamente por género. A continuación los hongos aislados e identificados.

Aspergillus niger

En SDA presentó una colonia polvorienta, de crecimiento rápido, negra al anverso y amarilla pálida al reverso. En Czapek mostró una colonia de crecimiento rápido, polvorienta, negra con centro amarillo pálido en el anverso y amarilla al reverso. Microscópicamente presentó hifas hialinas y tabicadas. Se observaron conidias unicelulares, rugosas, negras y redondas. Las conidias surgieron en cadenas radiales a partir de una segunda serie de fiálides (fialosporas) en el conidióforo y mostraron un diámetro de 3.8 µm. Se observaron conidióforos biseriados, hialinos, simples, largos y de 677.6 µm de altura. Los conidióforos se caracterizaron por tener en sus bases un pie basal en forma de T cuyo largo fue de 41.6 µm y ancho de 8.9 µm, y en el ápice una vesícula globosa de 31.7 µm de diámetro. Esta especie se aisló en la granja avícola de Moca durante la época de alta precipitación (Figura 5).

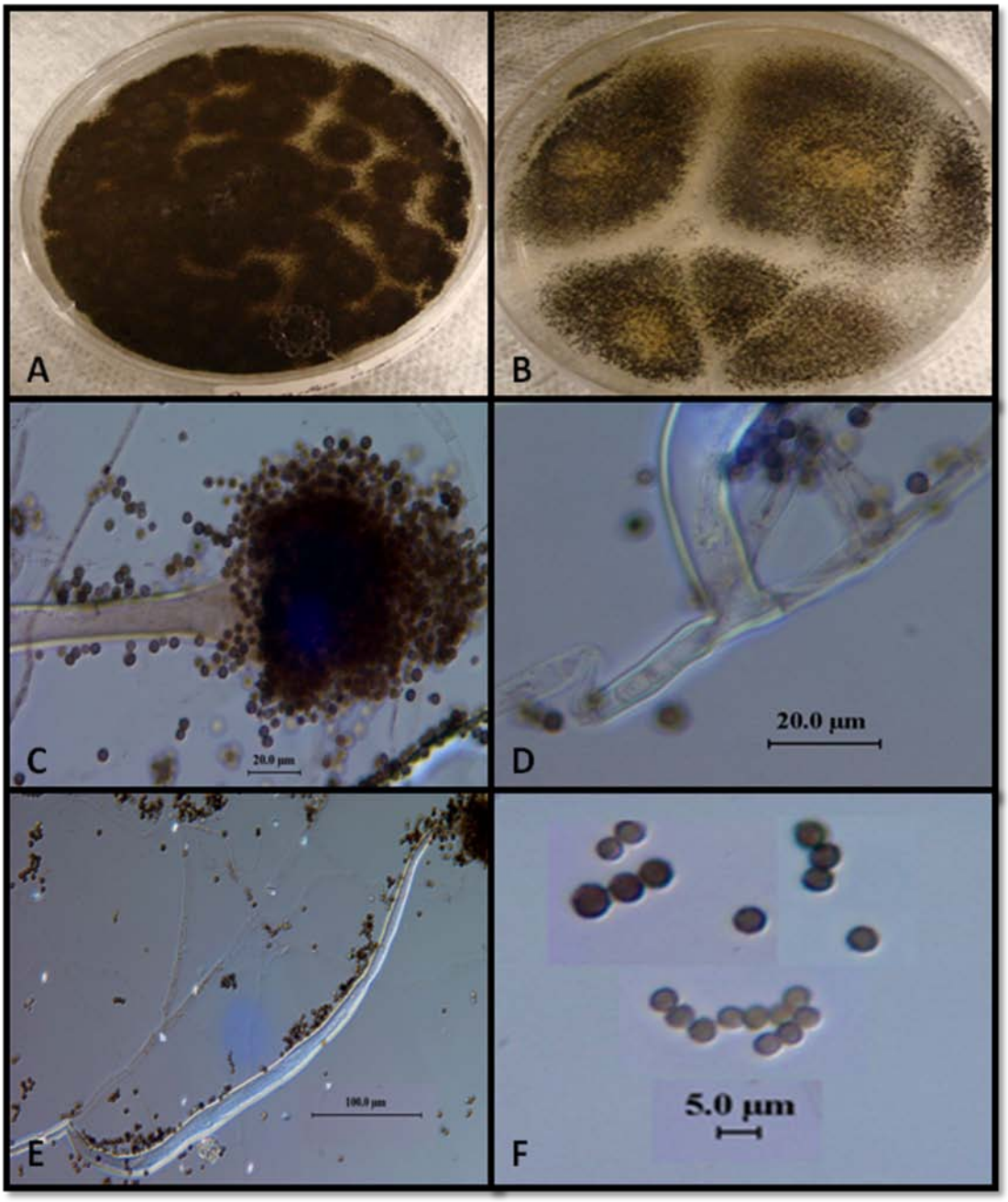

Figura 5. Características macroscópicas y microscópicas de *Aspergillus niger:*

(A) anverso de la colonia en SDA, (B) anverso de la colonia en Czapek, (C) vesícula globosa (Nomarski-400X), (D) pie basal (Nomarski-400X), (E) conidióforo (Nomarski-200X) y (F) conidias (Nomarski-600X).

Cladosporium cladosporioide

En SDA presentó una colonia con pliegues, redonda, polvorienta, borde filamentoso, gris oscura al anverso y negra al reverso. Microscópicamente presentó hifas marrones y tabicadas. Se observaron conidias unicelulares, marrones, lisas, elipsoidales y con cicatriz basal. Las conidias surgieron en cadenas acropetales largas, por la extensión de las células conidiógenas (blastoconidias) en el conidióforo, y mostraron un largo de 4.5 µm y un ancho de 2.6 µm. Se observaron conidióforos simples, delgados, marrones, ramificados en el ápice y con longitud de 106.8 µm. Se identificaron ramoconidias de 17.4 µm de largo. Esta especie se aisló en las granjas avícolas de Lajas y Moca durante la época de alta precipitación (Figura 6).

Coelomycete

En SDA presentó una colonia gamuza, redonda, borde filamentoso, grisácea al anverso, negra grisácea al reverso y picnidios marrones sumergidos. Microscópicamente presentó hifas hialinas y tabicadas. Se observaron conidias unicelulares, rugosas, hialinas, elípticas u ovoides, de 17.3 µm de largo y 6.0 µm de ancho. Las conidias surgieron individuales a partir de picnidios que midieron 114.9 µm de largo y 105.0 µm de ancho. Esta especie se aisló en la granja avícola de Moca durante la época de alta precipitación (Figura 7).

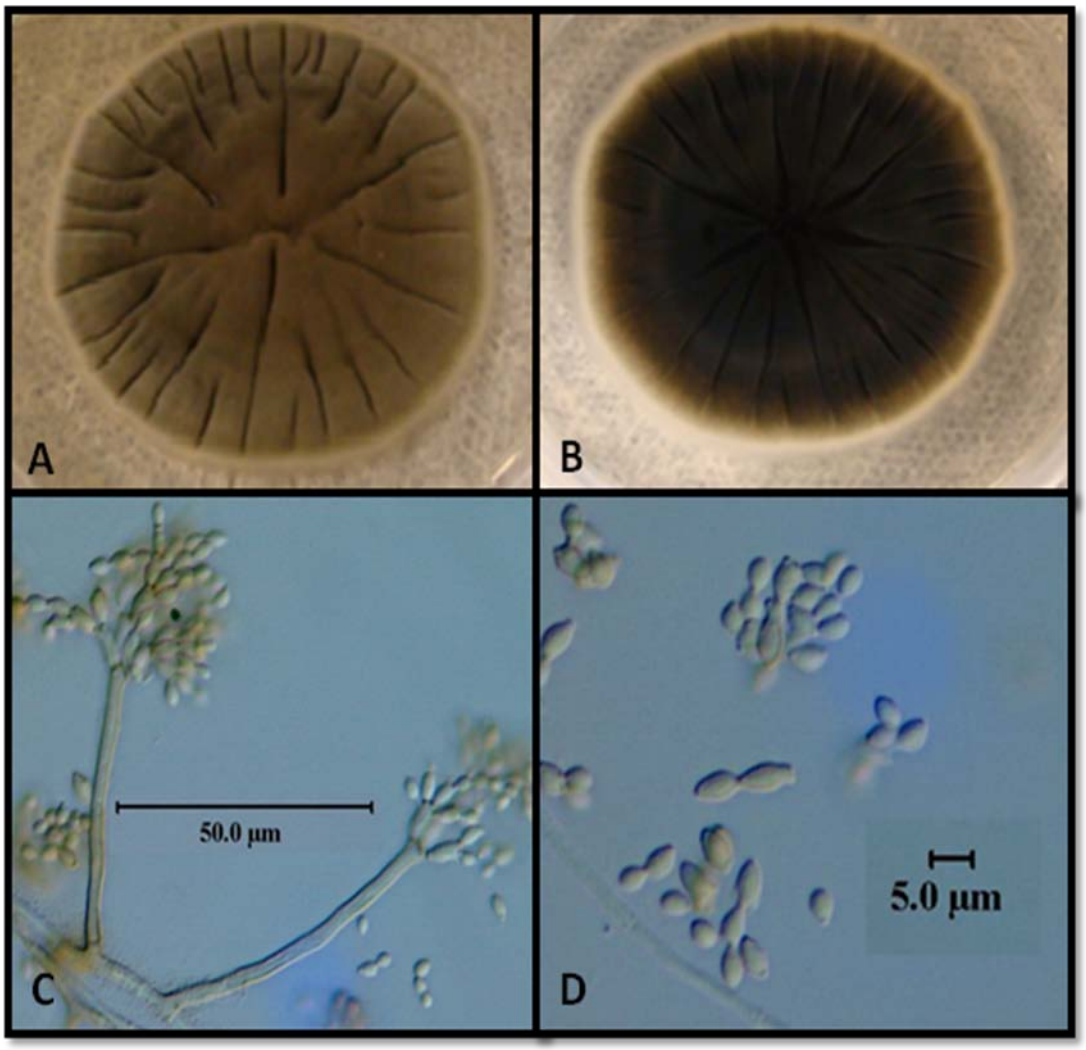

Figura 6. Características macroscópicas y microscópicas de *Cladosporium cladosporioide:*

(A) anverso de la colonia en SDA, (B) reverso de la colonia en SDA, (C) conidióforo (Nomarski-400X) y (D) conidias (Nomarski-400X)

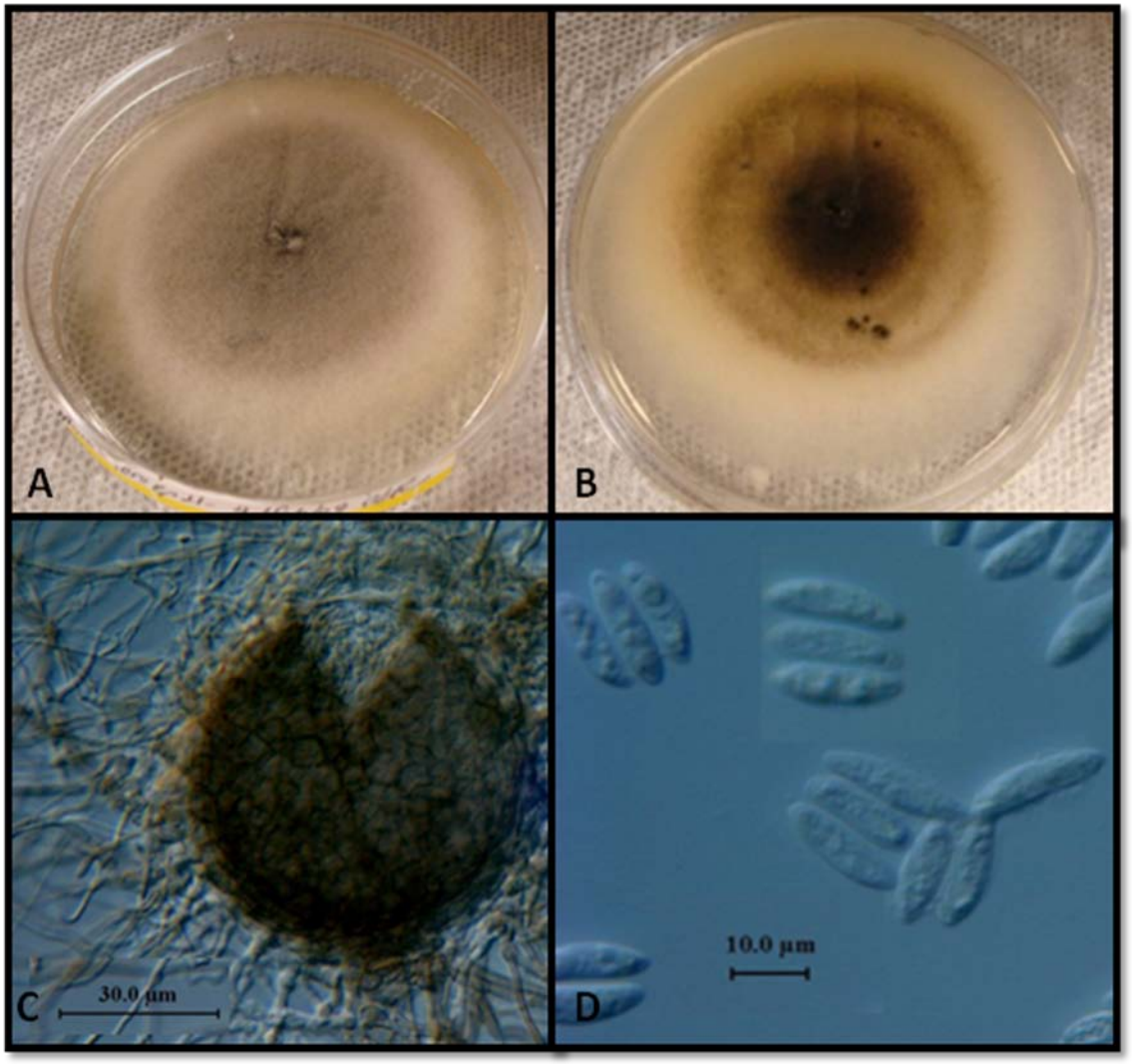

Figura 7. Características macroscópicas y microscópicas de un *Coelomycete:*

(A) anverso de la colonia en SDA, (B) picnidios y reverso de la colonia en SDA, (C) picnidio (Nomarski-400X) y (D) conidias (Nomarski-400X)

Nigrospora oryzae

En SDA presentó una colonia redonda, lanosa, borde filamentoso, exudados cristalinos, crema con puntos negros en el anverso y al reverso. Microscópicamente presentó hifas marrones y tabicadas. Se observaron conidias unicelulares, lisas, negras, redondas e individuales (aleurosporas). Las conidias midieron entre 12 a 15 µm de diámetro para un promedio de 14.0 µm. Se observaron conidióforos simples, globosos y con una sola conidia apical. Esta especie se aisló en la granja avícola de Moca durante la época de alta precipitación (Figura 8).

Bipolaris spicifera

En PDA presentó una colonia redonda, aterciopelada, borde filamentoso, centro marrón claro y borde marrón oscuro en el anverso, y marrón al reverso. Microscópicamente presentó hifas marrones y tabicadas. Se observaron conidias con tres septos transversales (4 células), lisas, rectas, cilíndricas, marrones, con hilo de germinación protuberante y con extremos redondeados. Las conidias surgieron de forma individual a través de poros (porosporas) en el ápice del conidióforo y mostraron un largo de 13.9 µm y un ancho de 3.7 µm. Se observaron conidióforos simples, delgados, tabicados, rectos, marrones, con un largo de 10.2 µm y un ancho de 3.4 µm. Esta especie se aisló en la granja avícola de Moca durante la época de alta precipitación (Figura 9).

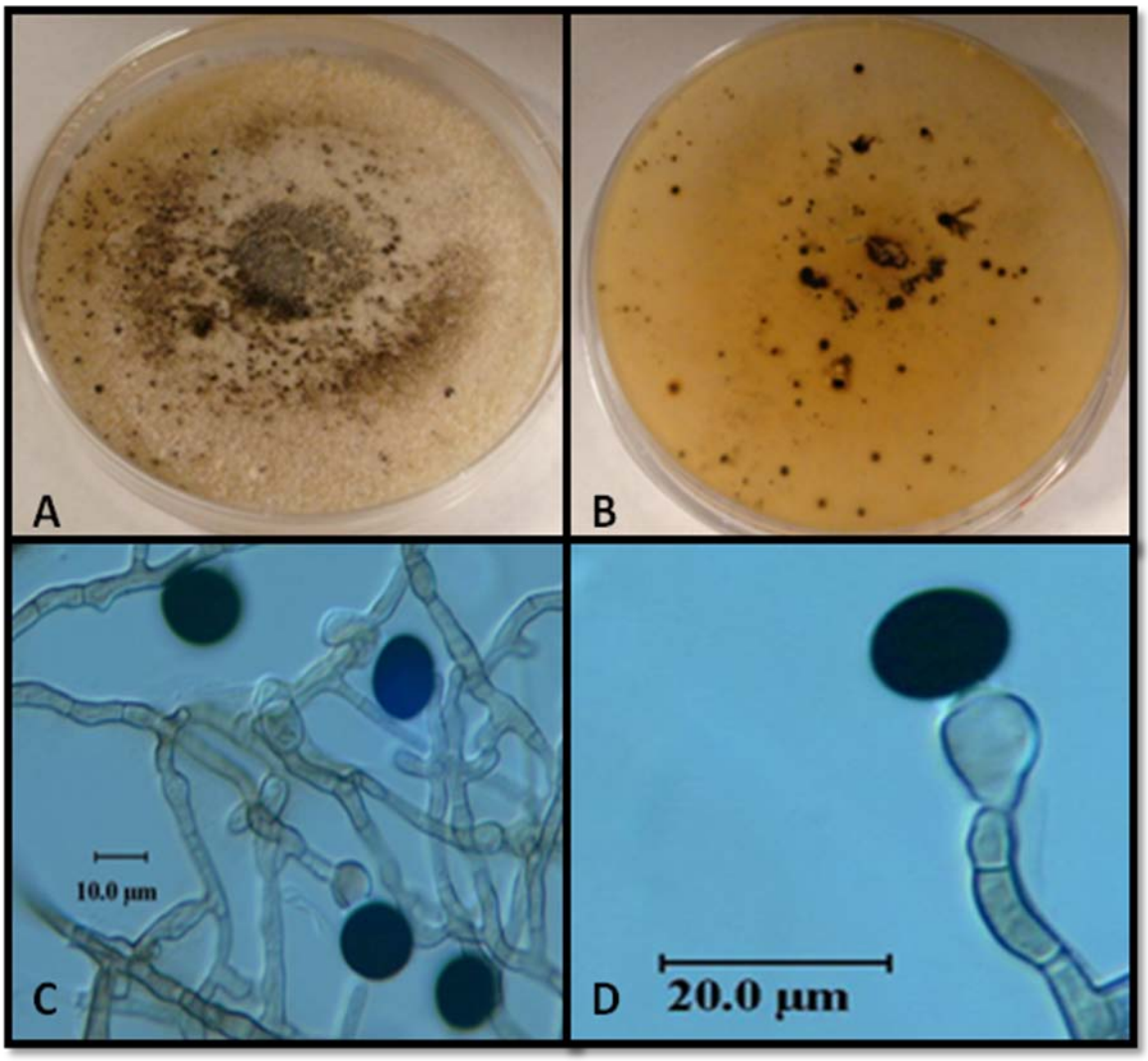

Figura 8. Características macroscópicas y microscópicas de *Nigrospora oryzae:*

(A) anverso de la colonia en SDA, (B) reverso de la colonia en SDA, (C) conidias (Nomarski-400X) y (D) conidióforo (Nomarski-400X)

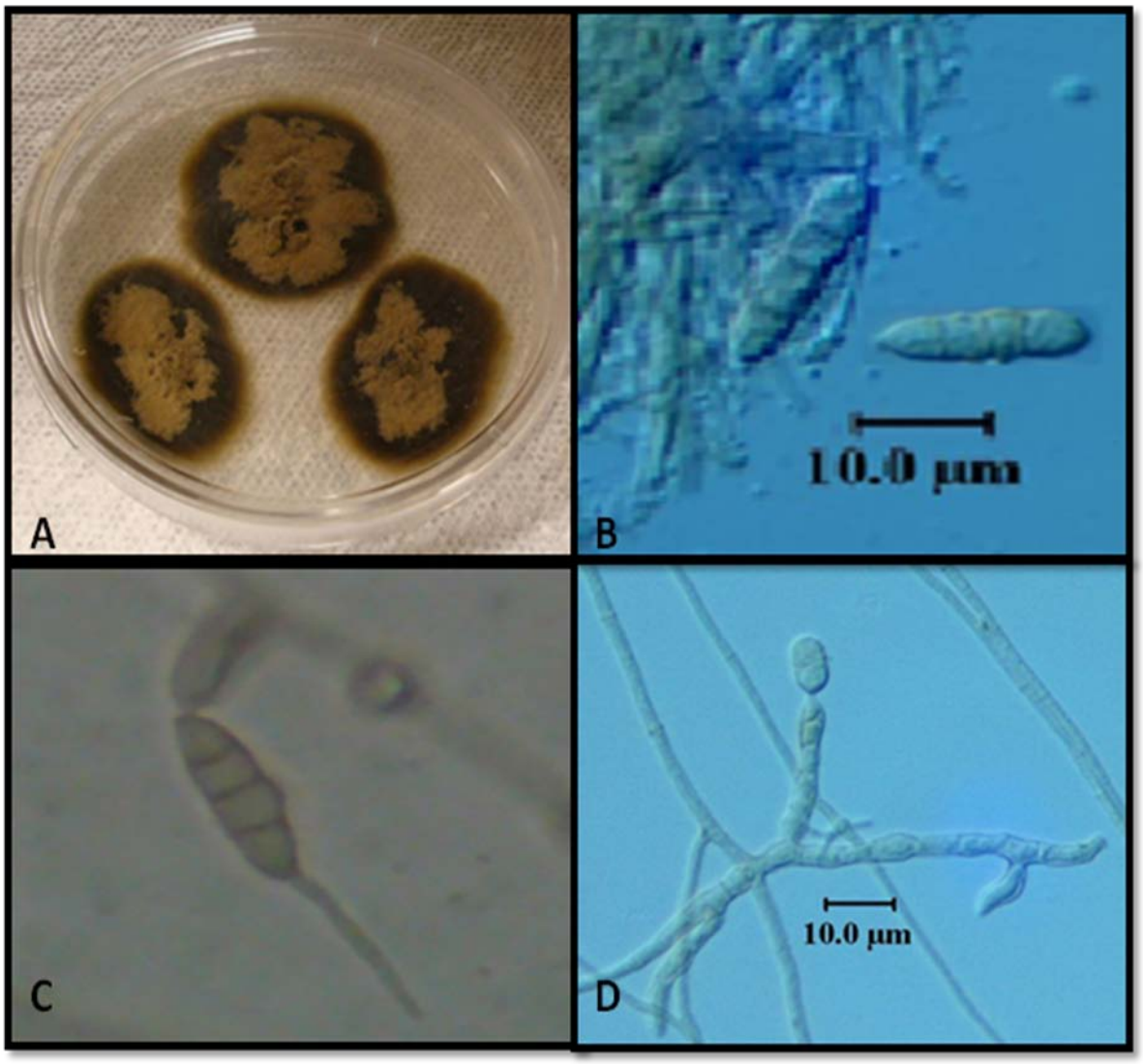

Figura 9. Características macroscópicas y microscópicas de *Bipolaris spicifera:*
(A) anverso de la colonia en PDA, (B) conidias (Nomarski-400X), (C) hilo conidial (Campo claro-600X) y (D) conidióforo (Nomarski-400X)

Penicillum spinulosum

En SDA presentó una colonia de crecimiento rápido, polvorienta, arrugada, azul verdosa oscura al anverso y amarrilla al reverso. En Czapek mostró una colonia polvorienta, de borde blanco y centro azul verdoso oscuro en el anverso e incolora al reverso. Microscópicamente presentó hifas hialinas y tabicadas. Se observaron conidias unicelulares, verrugosas, verdes y redondas. Las conidias surgieron a partir de fiálides (fialosporas) en el ápice del conidióforo y mostraron un diámetro de 2.7 µm. Se observaron conidióforos con pared rugosa, longitud de 137.3 µm y fiálides de 7.2 µm de largo. Los conidióforos se caracterizaron por ser hialinos, uniseriados (aunque algunos presentaron métulas de 9.0 µm de largo, pero la cantidad de éstos fue inferior a los uniseriados) y simples (algunos se ramificaron en el ápice, cuyas ramificaciones fueron de 15.6 µm de largo). Esta especie se aisló en la granja avícola de Moca durante la época de baja precipitación (Figura 10).

***Tripospermum* sp.**

En OA presentó una colonia de textura gamuza, crecimiento lento, redonda, borde filamentoso, y verde oliva oscura al anverso y al reverso. Microscópicamente presentó hifas marrones y tabicadas, y careció de conidióforos. Se observaron conidias que surgieron de forma individual directamente del micelio vegetativo. Las conidias se caracterizaron por tener un centro o tallo del cual se originan cinco ramas septadas transversalmente. Estas ramas no surgen simultáneamente y se localizan en dos dimensiones dando la apariencia de estrella. Las ramas se caracterizaron por ser lisas, marrones, cónicas y con extremos puntiagudos. Las longitudes de las ramas fueron, 36.2 µm la superior derecha, 37.8 µm la superior izquierda, 31.4 µm la inferior derecha, 19.2 µm la inferior izquierda y 36.7 µm la de atrás. Esta especie se aisló en la granja avícola de Moca durante la época de alta y baja precipitación, y en la granja avícola de Lajas durante la época de baja precipitación (Figura 11).

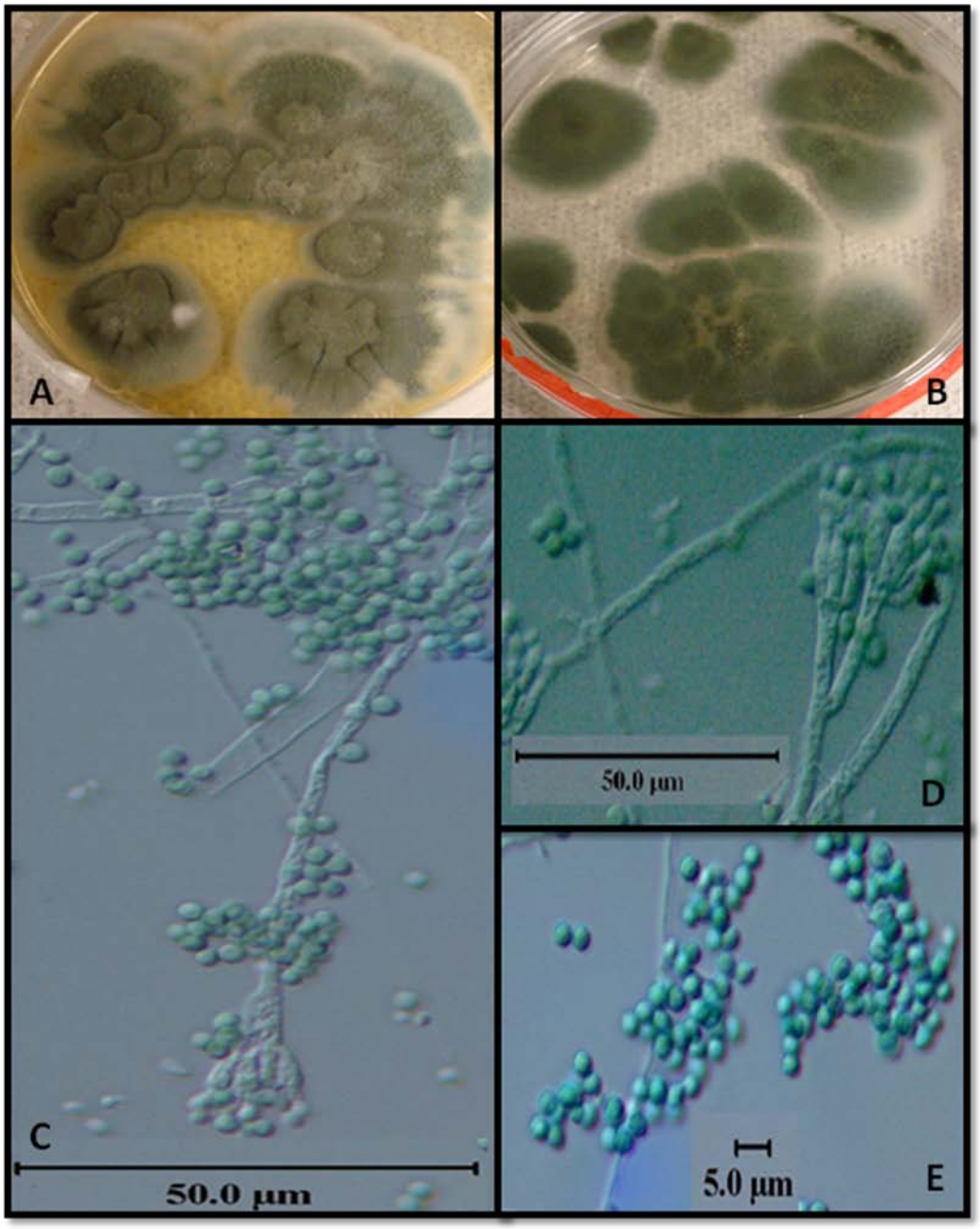

Figura 10. Características macroscópicas y microscópicas de *Penicillium spinulosum:*
(A) anverso de la colonia en SDA, (B) anverso de la colonia Czapek, (C) conidióforo (Nomarski-400X), (D) ápice del conidióforo (Nomarski-400X) y (E) conidias (Nomarski-400X)

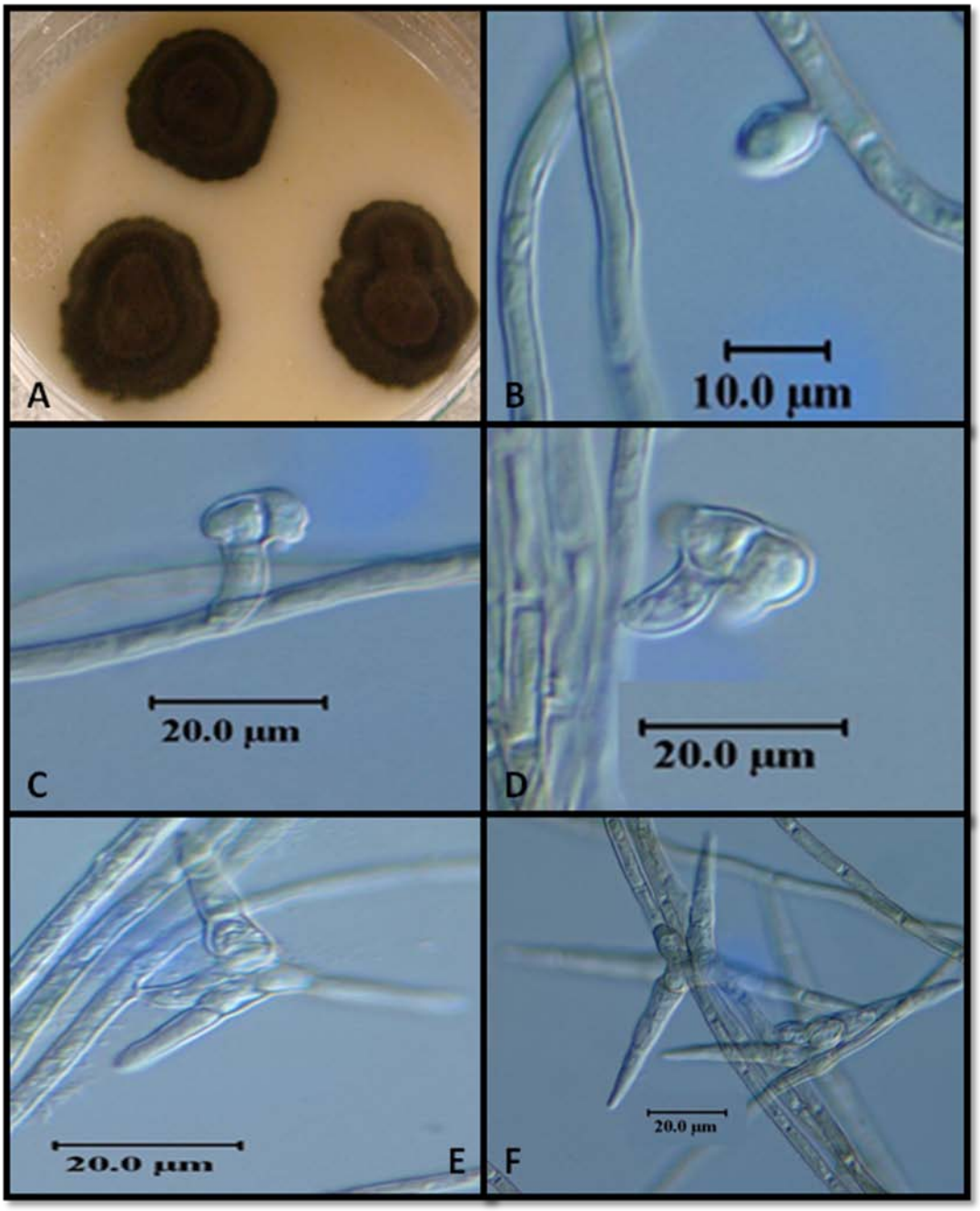

Figura 11. Características macroscópicas y microscópicas de *Tripospermum* sp.:

(A) anverso de la colonia en OA, (B) surgimiento de conidia (Nomarski-400X), (C) y (D) formación de ramas conidiales (Nomarski-400X), (E) formación final de una conidia (Nomarski-400X) y (F) conidias (Nomarski-400X)

Cladosporium sphaerospermum

En SDA presentó una colonia con pliegues, redonda, lanosa, borde filamentoso, verde oliva al anverso y verde oliva oscuro al reverso. Microscópicamente presentó hifas marrones y tabicadas. Se observaron conidias globosas a subglobosas, unicelulares, lisas, marrones y con cicatriz basal. Las conidias surgieron en cadenas acropetales, por el alargamiento de las células conidiógenas (blastoconidias) en el conidióforo, y mostraron un diámetro de 3.4 µm. Se observaron conidióforos simples, pálidos, delgados, ramificados en el ápice, cortos y con un largo de 64.4 µm. Se identificaron ramoconidias de 25.0 µm de largo. Esta especie se aisló en la granja avícola de Moca durante la época de alta y baja precipitación (Figura 12).

Curvularia brachyspora

En PDA presentó una colonia de crecimiento rápido, borde filamentoso, redonda, algodonosa, gris oscura al anverso y negra al reverso. Microscópicamente presentó hifas marrones y tabicadas. Se observaron conidias lisas, marrones, rectas a levemente curvas, con células centrales más oscuras y alargadas que las demás. Las conidias se caracterizaron por tener tres septos transversales (4 células), y porque el septo central está ubicado en la región más ancha de la conidia y es mayormente más grueso y oscuro que los demás septos. Las conidias surgieron de forma individual a través de poros (porosporas) en el conidióforo y mostraron un largo de 20.9 µm y un ancho de 9.4 µm. Se observaron conidióforos simples, delgados, tabicados, rectos, inclinados levemente en el ápice y con un largo de 87.4 µm. Esta especie se aisló en la granja avícola de Moca durante la época de baja precipitación (Figura 13).

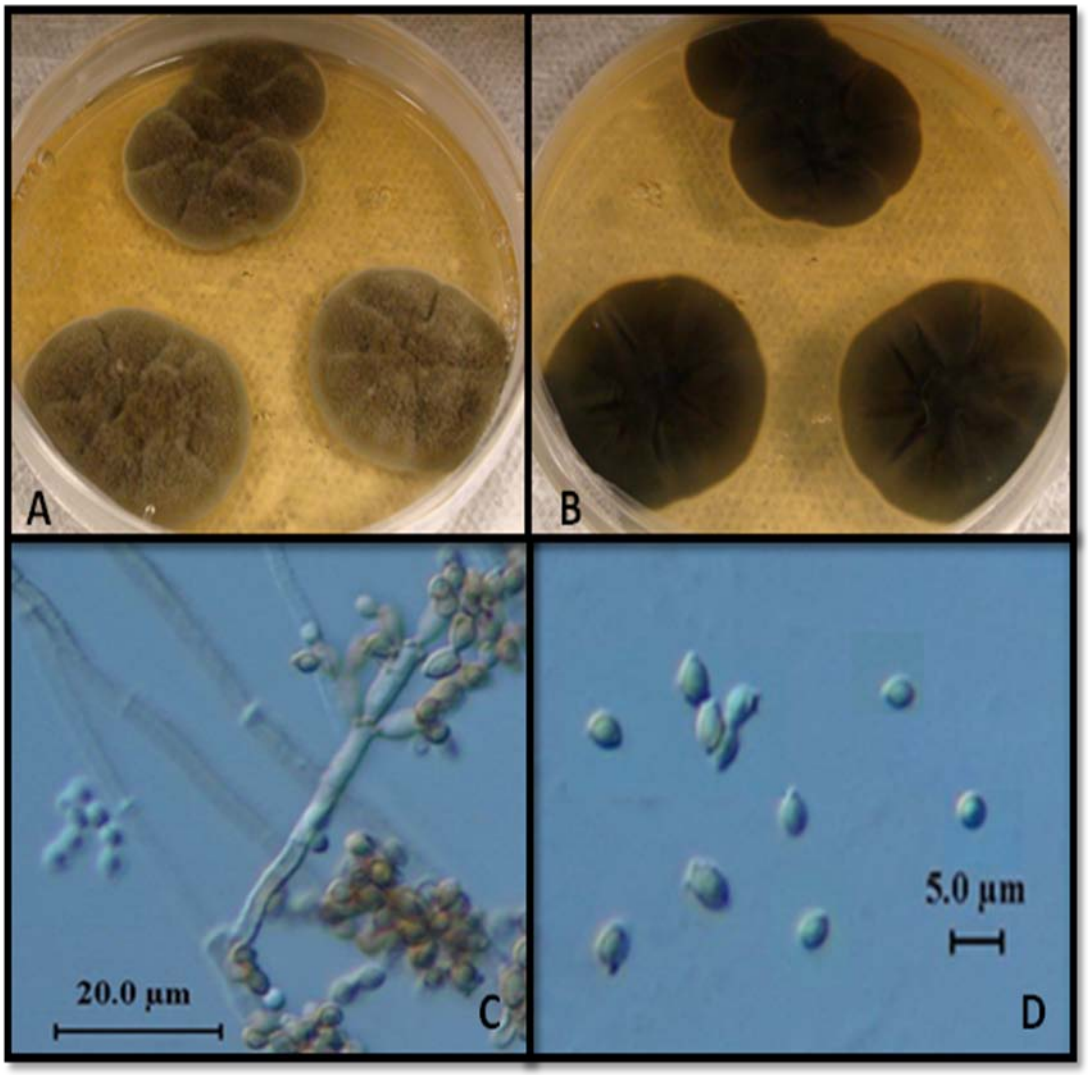

Figura 12. Características macroscópicas y microscópicas de *Cladosporium sphaerospermum:*
(A) anverso de la colonia en SDA, (B) reverso de la colonia en SDA, (C) conidióforo (Nomarski-400X) (D) conidias (Nomarski-400X)

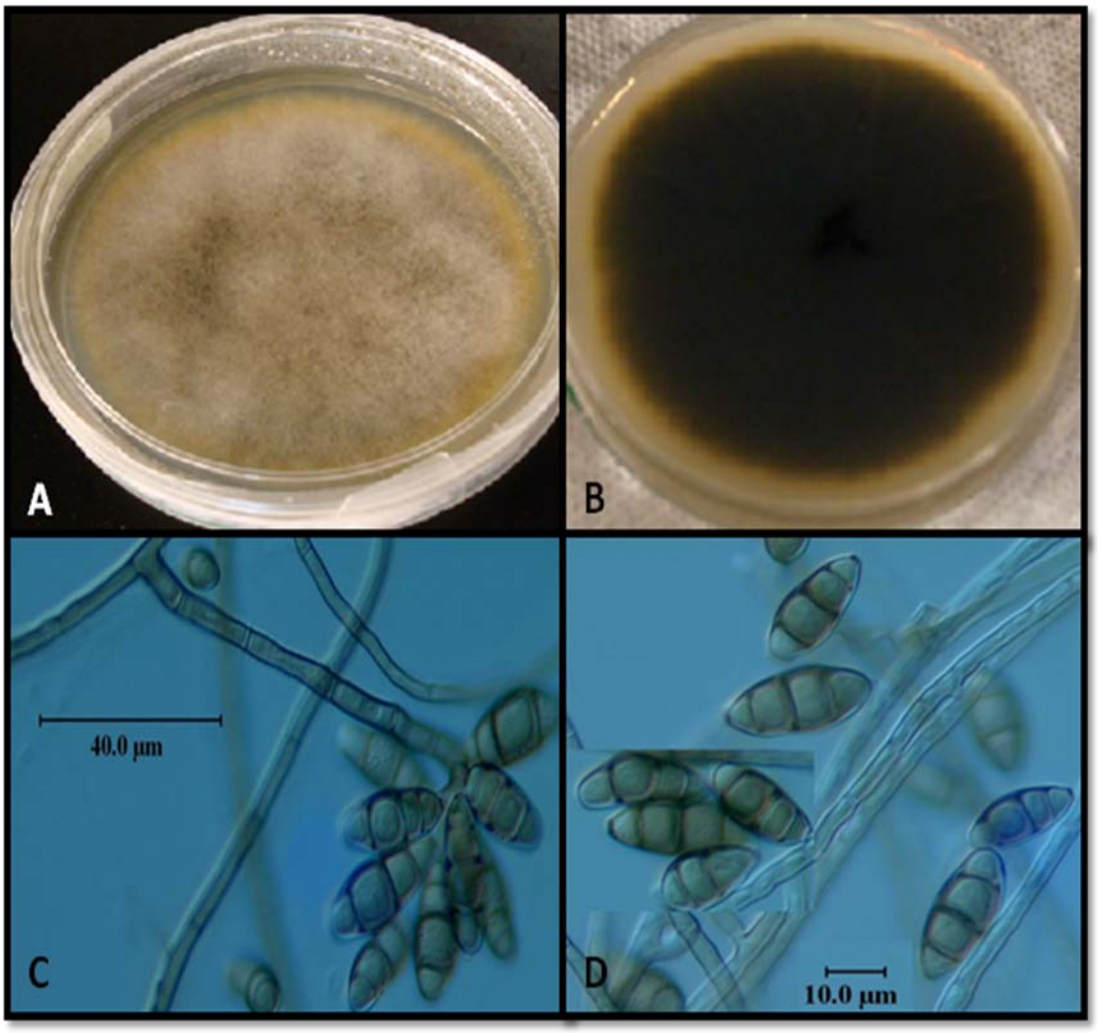

Figura 13. Características macroscópicas y microscópicas de *Curvularia brachyspora:*

(A) anverso de la colonia en PDA, (B) reverso de la colonia en PDA, (C) conidióforo (Nomarski-400X) y (D) conidias (Nomarski-400X)

Aspergillus versicolor

En PDA presentó una colonia de crecimiento rápido, polvorienta, centro verde limón y borde anaranjado pálido al anverso, y anaranjado-marrón al reverso. En Czapek mostró una colonia aterciopelada, que en el anverso comenzó blanca, luego paso a amarilla pálida, posteriormente a amarilla-anaranjada pálida y finalmente a verde oscura; mientras que al reverso fue anaranjada pálida. Microscópicamente presentó hifas hialinas y tabicadas. Se observaron conidias unicelulares, lisas, verdes y redondas. Las conidias surgieron en cadenas radiales a partir de una segunda serie de fiálides (fialosporas) en el conidióforo y mostraron un diámetro de 2.7 µm. Se observaron conidióforos biseriados, hialinos, simples, largos y de 313.9 µm de altura. Los conidióforos se caracterizaron por tener en sus bases un pie basal en forma de T cuyo largo fue de 21.2 µm y ancho de 3.3 µm, y en ápice una vesícula ocasionalmente globosa y usualmente en forma de matraz de base esférica de 13.1µm de diámetro . Esta especie se aisló en la granja avícola de Moca durante la época de alta precipitación (Figura 14).

Penicillium waksmani

En SDA presentó una colonia de crecimiento rápido, polvorienta, arrugada, borde blanco y centro gris oliva al anverso, y amarrilla pálida al reverso. En Czapek mostró una colonia aterciopelada, incolora al reverso, y borde blanco y centro oliva oscuro al anverso. Microscópicamente presentó hifas hialinas y tabicadas. Se observaron conidias unicelulares, lisas, verdes, pequeñas y redondas. Las conidias surgieron a partir de fiálides (fialosporas) en el ápice del conidióforo y mostraron un diámetro de 1.9µm. Se observaron conidióforos con longitud de 143.3 µm, fiálides de 8.1 µm de largo y levemente inflados en el ápice. Los conidióforos se caracterizaron por ser hialinos, lisos, cortos, tabicados, uniseriados, simples y ocasionalmente ramificados en el ápice con ramas de 13.5µm de largo. Esta especie se aisló en la granja avícola de Lajas durante la época de alta precipitación (Figura 15).

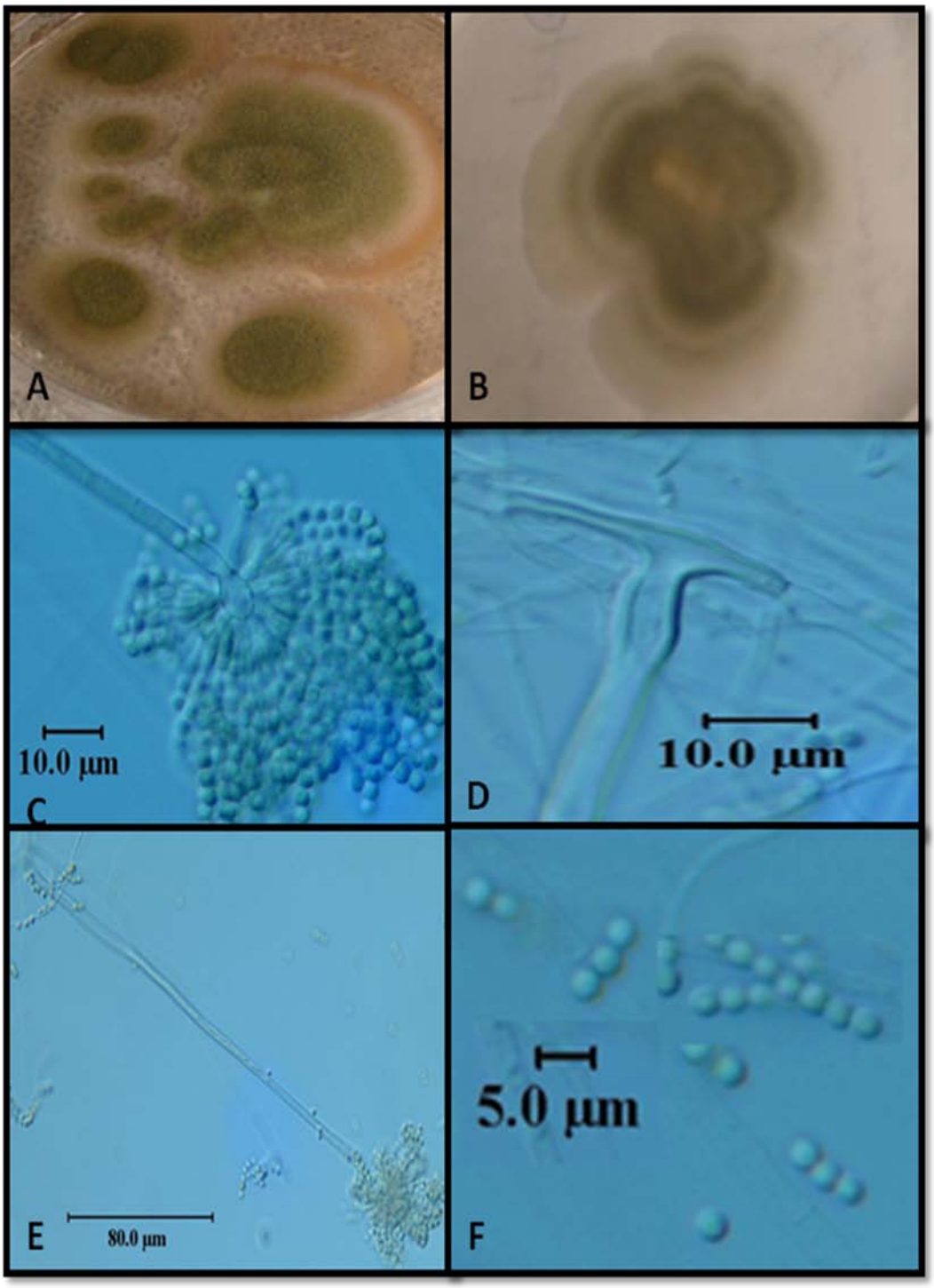

Figura 14. Características macroscópicas y microscópicas de *Aspergillus versicolor:*
(A) anverso de la colonia en PDA, (B) anverso de la colonia en Czapek, (C) vesícula (Nomarski-400X), (D) pie basal (Nomarski-400X), (E) conidióforo (Nomarski-200X) y (F) conidias (Nomarski-400X)

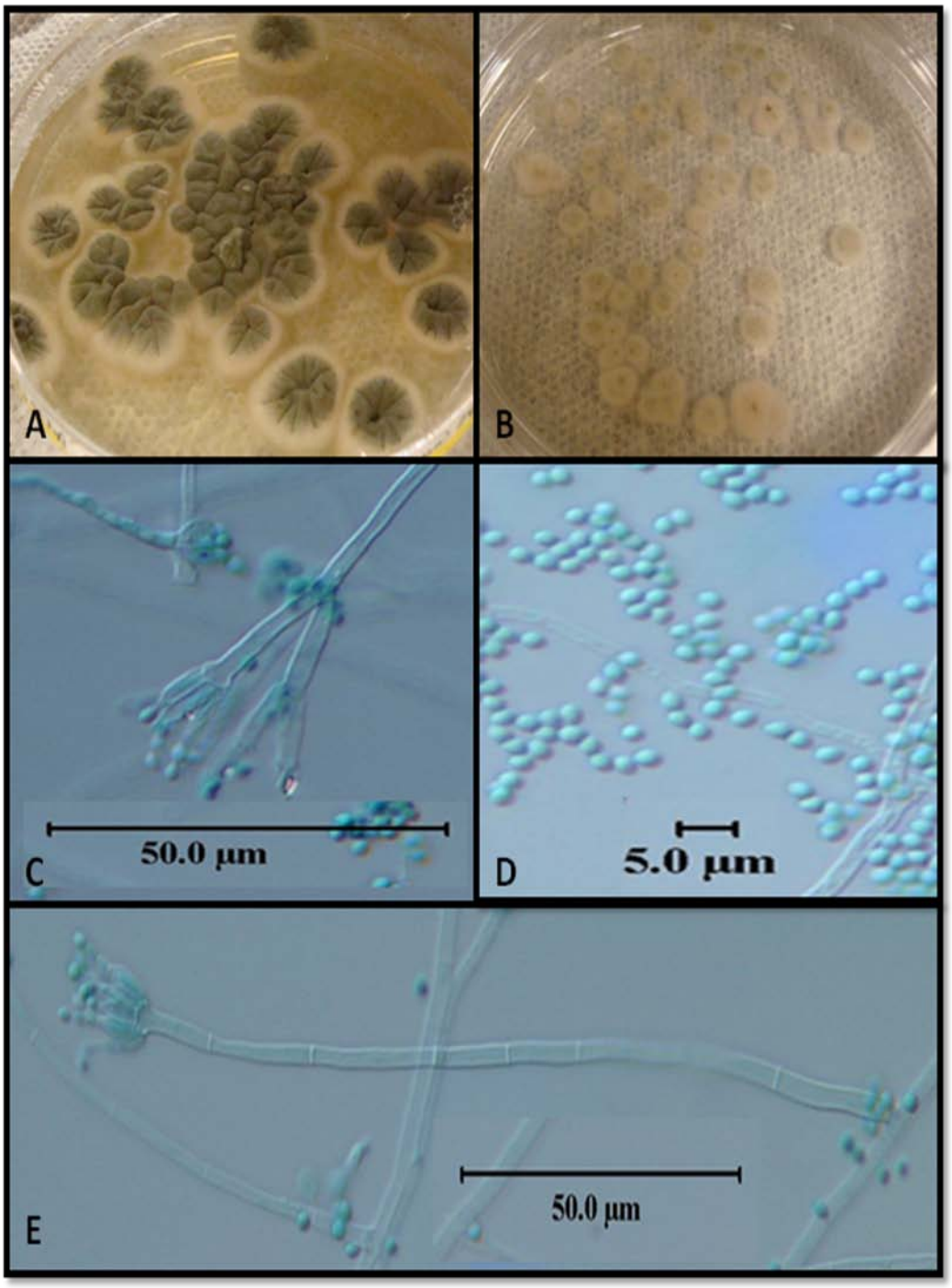

Figura 15. Características macroscópicas y microscópicas de *Penicillium waksmani:*
(A) anverso de la colonia en SDA, (B) anverso de la colonia Czapek, (C) ápice del conidióforo (Nomarski-400X), (D) conidias (Nomarski-400X) y (E) conidióforo (Nomarski-400X)

Curvularia lunata

En PDA presentó una colonia con pliegues, redonda, aterciopelada, borde filamentoso, marrón grisácea al anverso y marrón oscura al reverso. Microscópicamente presentó hifas marrones y tabicadas. Se observaron conidias con tres septos transversales (4 células), levemente curvas, lisas, marrones, con una de las células centrales más oscuras y alargadas que las demás. Las conidias surgieron de forma individual a través de poros (porosporas) en el conidióforo y mostraron un largo de 19.9 µm y un ancho de 8.2 µm. Se observaron conidióforos simples, rectos, delgados, tabicados y con un largo de 81.5 µm. Esta especie se aisló en la granja avícola de Moca durante la época de baja precipitación (Figura 16).

***Gonabotitrys* sp.**

En SDA presentó una colonia redonda, lanosa, con anillos, borde filamentoso, gris al anverso y negra al reverso. Microscópicamente presentó hifas tabicadas y de marrón claro. Se observaron conidias unicelulares, lisas, hialinas y ovoides a subglobosas. Las conidias surgieron de forma individual a partir de células infladas en el conidióforo y mostraron un largo de 3.5µm y un ancho de 2.7 µm. Se observaron conidióforos marrón claro, simples, delgados, tabicados, con células infladas terminales e intercaladas y con un largo de 143.6 µm y un ancho de 2.8 µm. Las células infladas presentaron un largo de 4.7 µm y un ancho de 2.8 µm. Esta especie se aisló en la granja avícola de Moca durante la época de baja precipitación (Figura 17).

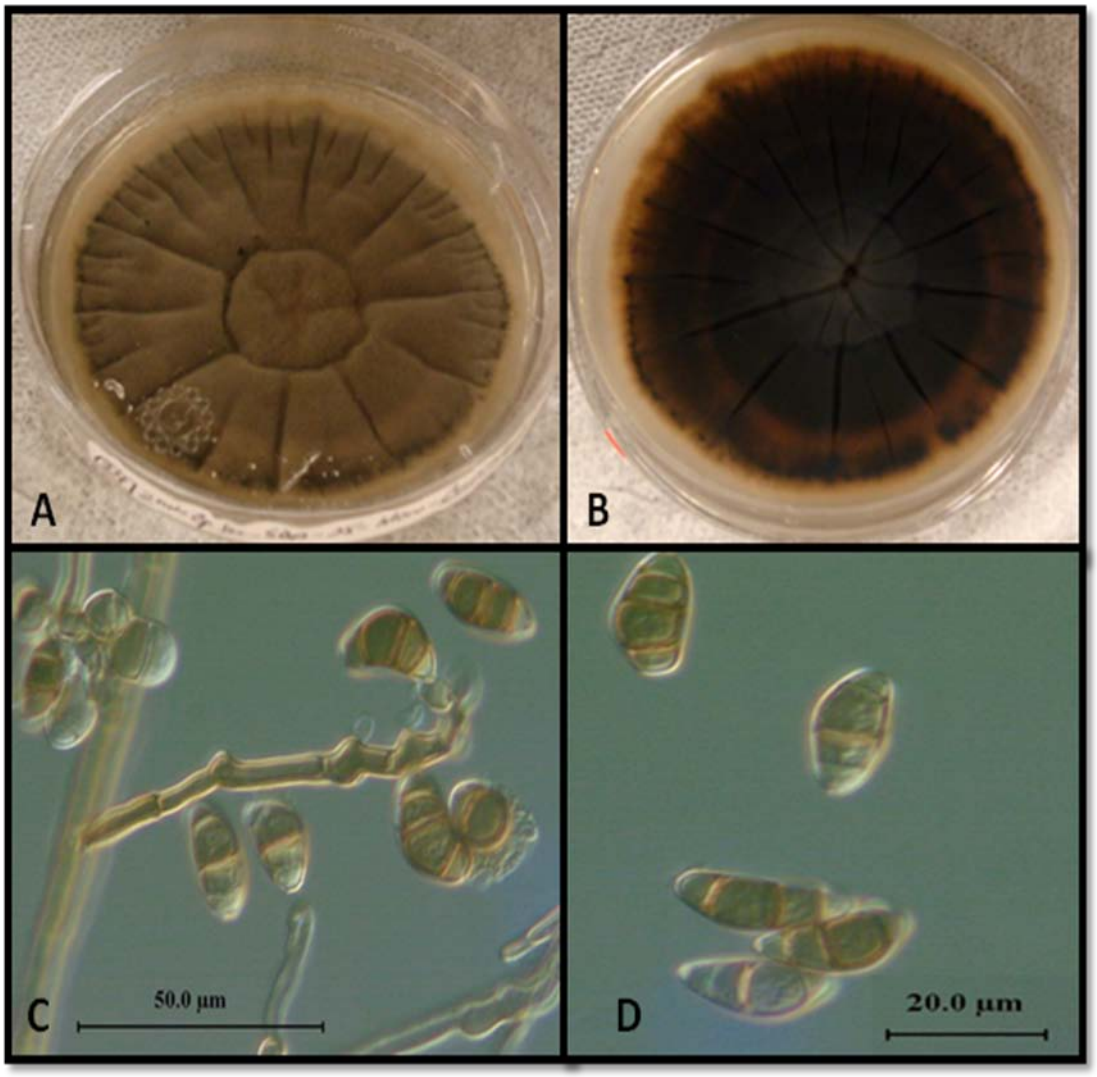

Figura 16. Características macroscópicas y microscópicas de *Curvularia lunata:*
(A) anverso de la colonia en PDA, (B) reverso de la colonia en PDA, (C) conidióforo (Nomaraski-400X) y (D) conidias (Nomarski-400X)

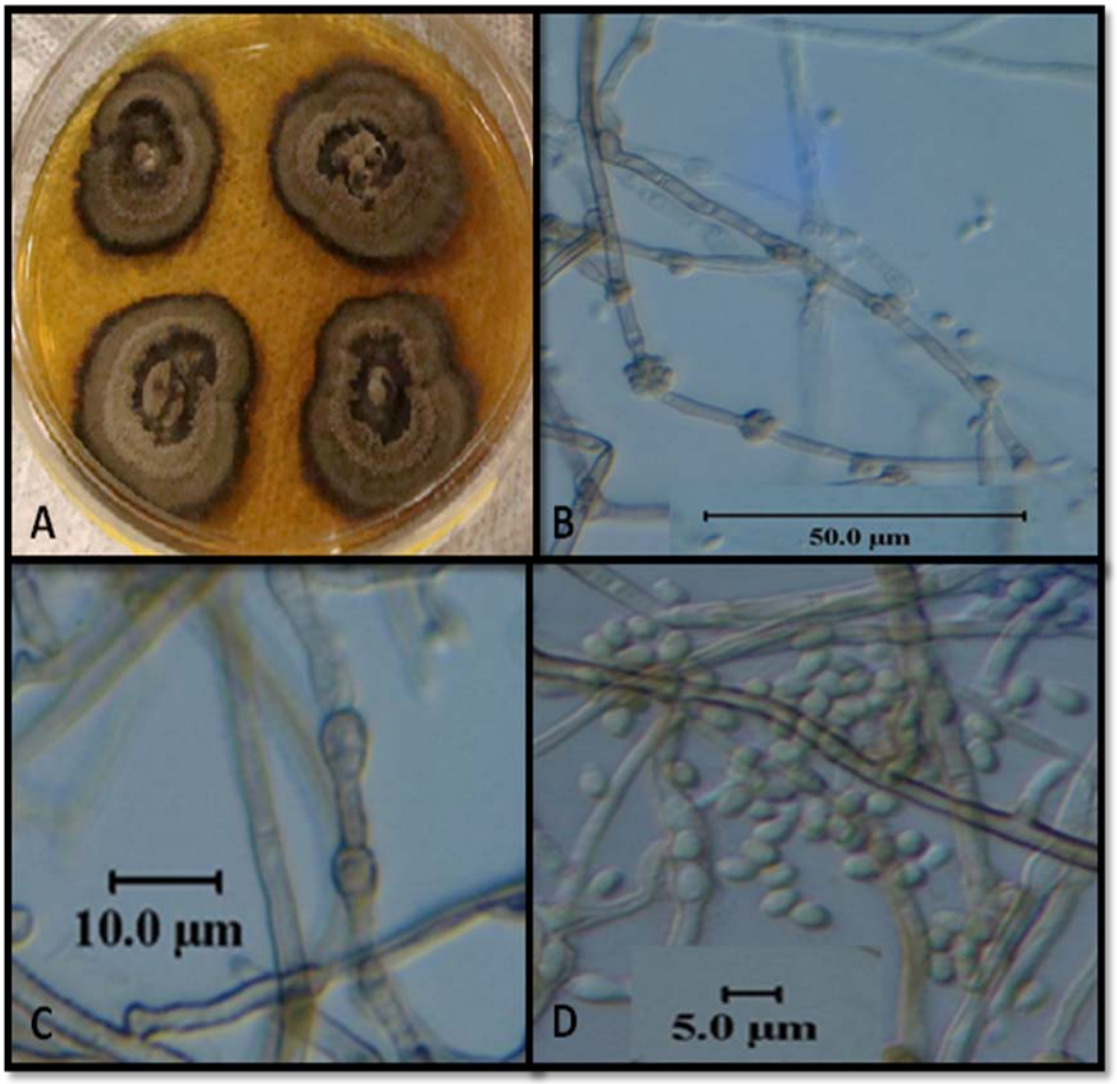

Figura 17. Características macroscópicas y microscópicas de *Gonabotitrys* sp.:
(A) anverso de la colonia en SDA, (B) conidióforo (Nomarski-400X), (C) células hinchadas del conidióforo (Nomarski-600X) y (D) conidias (Nomarski-400X)

Penicillium frequentans

En PDA presentó una colonia de crecimiento rápido, polvorienta, verde oliva al anverso y amarrilla-rojiza al reverso. En Czapek mostró una colonia algodonosa, borde blanco y centro grisáceo en el anverso, y crema al reverso. Microscópicamente presentó hifas hialinas y tabicadas. Se observaron conidias unicelulares, verdes, lisas y redondas. Las conidias surgieron a partir de fiálides (fialosporas) en el ápice del conidióforo y mostraron un diámetro de 2.4 µm. Se observaron conidióforos de pared lisa, longitud de 139.4 µm y fálides de 6.8 µm de largo. Los conidióforos se caracterizaron por ser hialinos, inflados en el ápice, uniseriados (aunque algunos presentaron métulas de 11.3 µm de largo, pero la cantidad de éstos fue inferior a los uniseriados) y simples (algunos se ramificaron en el ápice, cuyas ramificaciones fueron de 18.3µm de largo). Esta especie se aisló en la granja avícola de Moca durante la época de alta precipitación (Figura 18).

Curvularia senegalensis

En PDA presentó una colonia con forma irregular, borde filamentoso, aterciopelada en el borde, lanosa en el centro, borde verde oliva y centro gris al anverso, y verde oliva oscura al reverso. Microscópicamente presentó hifas marrones y tabicadas. Se observaron conidias con tres a cuatro septos transversales (4 a 5 células), lisas, rectas, marrones, con células centrales más oscuras y alargadas que las demás. Las conidias surgieron de forma individual a través de poros (porosporas) en el conidióforo y mostraron un largo de 23.6 µm y un ancho de 11.2 µm. Se observaron conidióforos simples, flexibles, delgados, tabicados, cortos y con un largo de 36.4 µm. Esta especie se aisló en la granja avícola de Moca durante la época de baja precipitación (Figura 19).

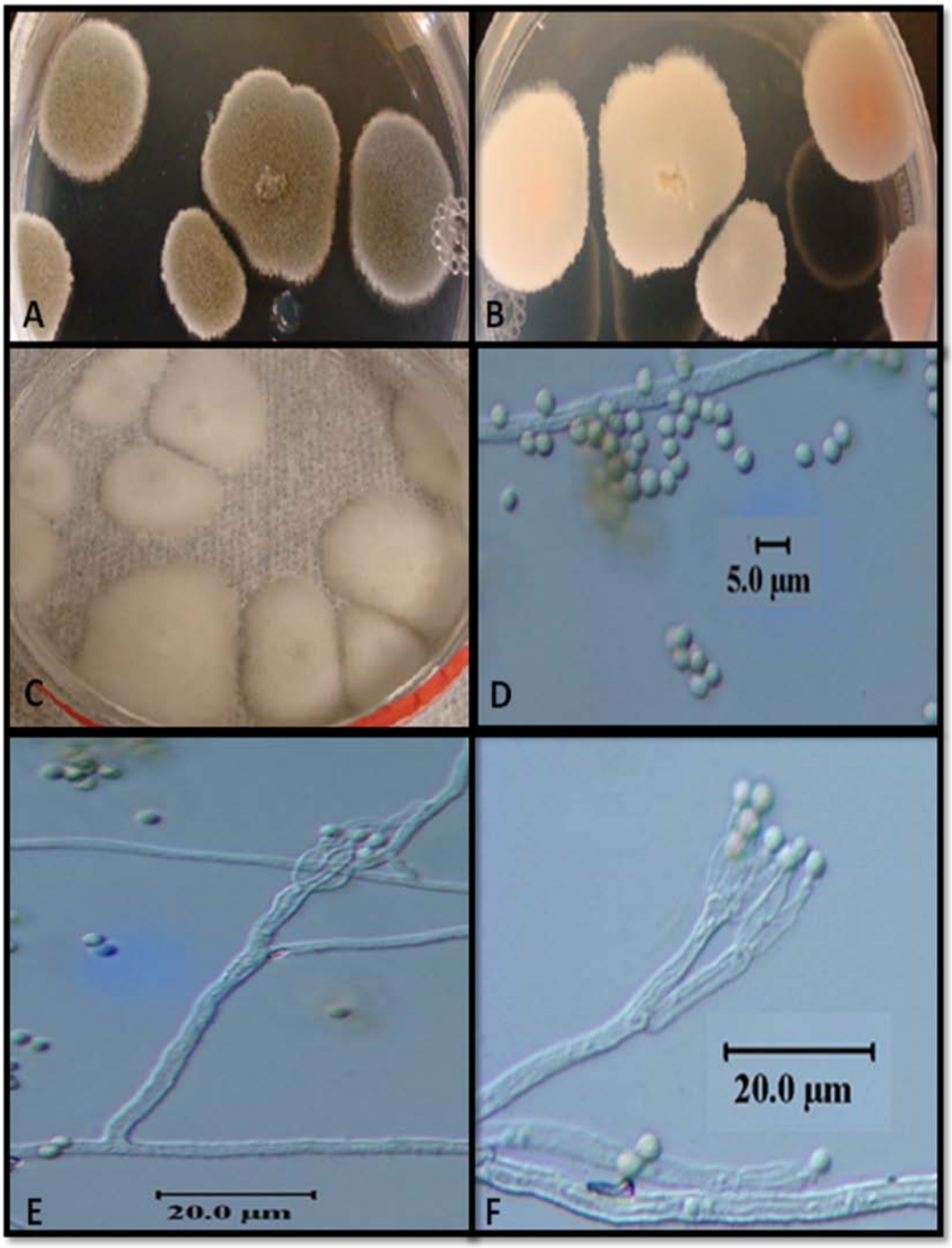

Figura 18. Características macroscópicas y microscópicas de *Penicillium frequentans:*
(A) anverso de la colonia en PDA, (B) reverso de la colonia en PDA, (C) anverso de la colonia Czapek, (D) conidias (Nomarski-400X), (E) conidióforo (Nomarski-400X) y (F) ápice del conidióforo (Nomarski-400X)

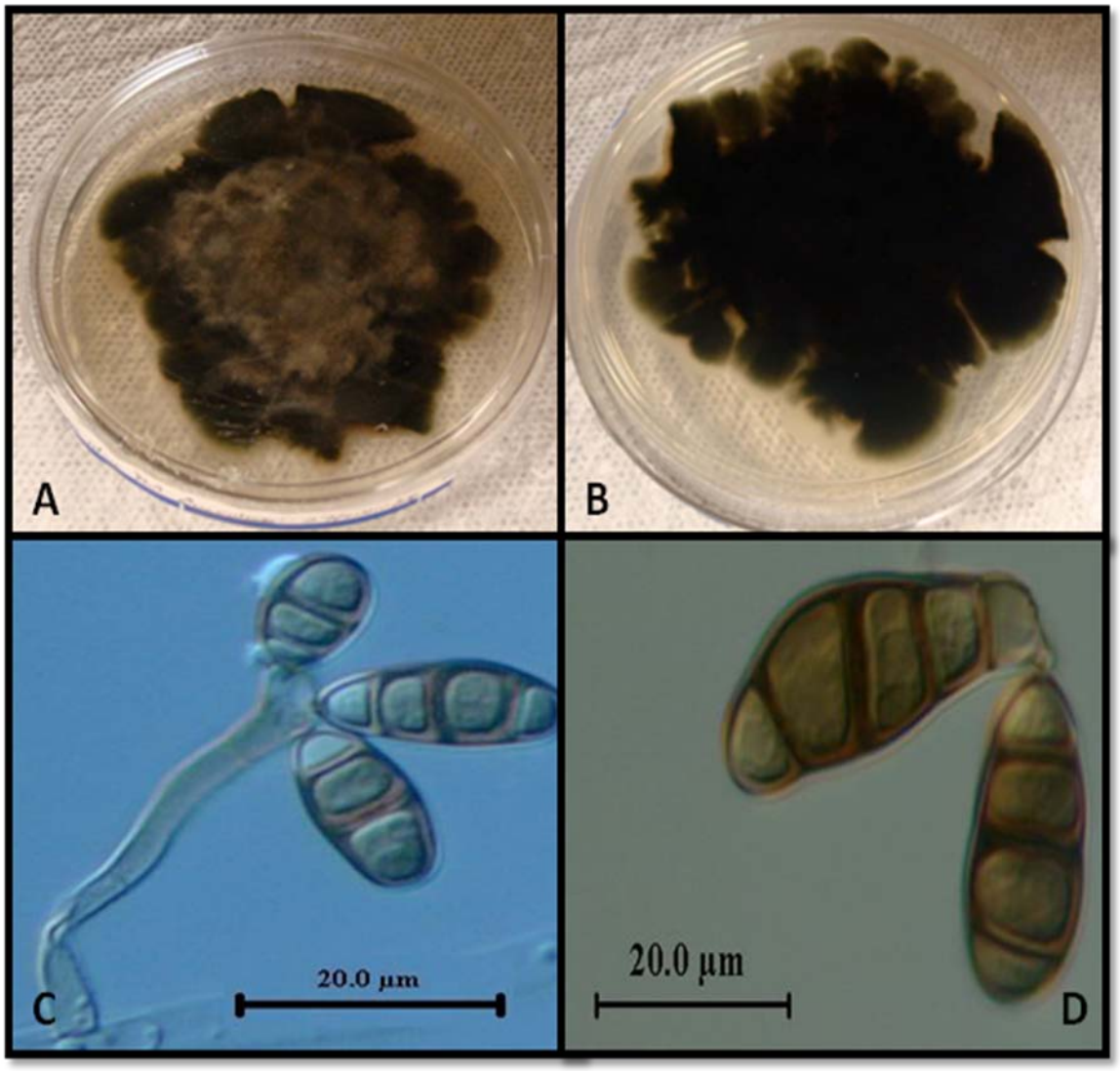

Figura 19. Características macroscópicas y microscópicas de *Curvularia senegalensis:*

(A) anverso de la colonia en PDA, (B) reverso de la colonia en PDA, (C) conidióforo (Nomarski-400X) y (D) conidias (Nomarski-400X)

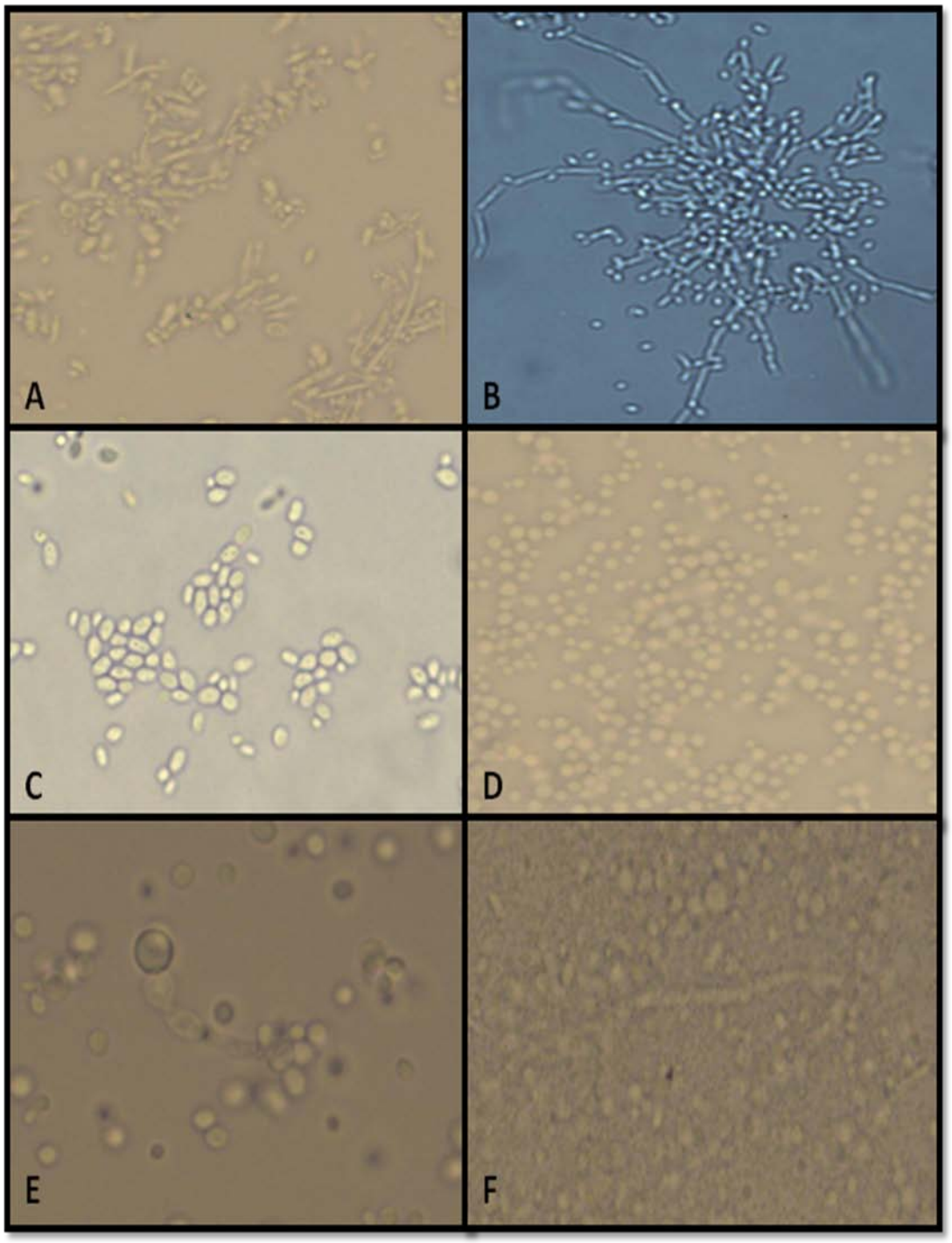

Figura 20. Características microscópicas de levaduras aisladas:

(A) células y pseudohifas de *Candida ciferrii* (Campo claro-600X), (B) células y pseudohifas de *Candida parapsilosis* (Campo claro-600X), (C) células de *Rhodotorula mucilaginosa* (Campo claro-600X), (D) células de *Candida famata* (Campo claro-600X), (E) células y clamidiospora al final de pseudohifa de *Candida albicans* (Campo claro-600X) y (F) células y pseudohifa de *Candida guillermondii* (Campo claro-600X)

Levaduras

Se determinó la presencia o ausencia de pseudohifas y clamidiosporas, y la forma de las células de las levaduras, al crecerlas en el medio de cultivo CMA. *Candida ciferrii* presentó células ovaladas, y pseudohifas delgadas y cortas. En cambio, *Candida parapsilosis* presentó células semi-esféricas, y pseudohifas delgadas y largas. *Rhodoturula mucilaginosa* se caracterizó por células ovaladas y ausencia de pseudohifas. *Candida famata* presentó células esféricas y no produjo pseudohifas. *Candida albicans* mostró células esféricas, pseudohifas cortas y anchas, y clamidiosporas al final de las pseudohifas. *Candida guillermondii* se caracterizó por células ovaladas, y pseudohifas delgadas y largas. Las levaduras *R. mucilaginosa*, *C. parapsilosis* y *C. ciferrii* se aislaron en ambas granjas y épocas de estudio. Las especies *C. famata* y *C. guillermondii* se aislaron en ambas granjas en la época de mayor precipitación, y *C. albicans* se aisló únicamente en la granja de Moca en la época de mayor precipitación (Figura 20).

DISCUSIÓN

Diversidad y presencia fúngica coprófila relacionada a las temporadas de muestreo

La presencia y diversidad de hongos coprófilos durante el periodo de alta precipitación fue mayor que durante el periodo de baja precipitación. Investigaciones como la de Yocom y Wicklow (1980) aseguran aumentos en la comunidad coprófila al aumentar las precipitaciones. Sin embargo en este estudio, estadísticamente se encontró que esta diferencia no es significativa. Estudios como el de Piontelli *et al*. (2006) muestran que no existen diferencias significativas entre épocas del año cuando las áreas estudiadas no reflejan ambientes extremadamente diferenciados, por lo que esto podría ser una posible explicación para los resultados encontrados en esta investigación. En Puerto Rico, aunque podemos distinguir zonas climatológicas, este cuenta con un clima tropical en toda la Isla con variaciones estacionales mínimas y con lluvias tropicales constante a lo largo de todo el año, teniendo mayor frecuencia en los meses de mayo a septiembre y menor en los meses de diciembre a marzo (Santillana, 2002). Otra posible explicación es que las variables físico-químicas (pH, temperatura y humedad) analizadas en las heces de las gallinas ponedoras se mantuvieron en intervalos que permitían la presencia fúngica. El pH fue ligeramente alcalino, las temperaturas estuvieron entre los 27 a 35 °C y la humedad estuvo sobre 55%. Los hongos pueden existir en límites de pH de 2 a 9, de 4 a 60 °C en temperatura y con una humedad sobre 55% (Herrera y Ulloa, 1990; Hawksworth, 1997; Bial, 2002). En varias investigaciones se ha indicado que los hongos coprófilos tienen una distribución universal que está influenciada por la presencia de animales, tipos de vegetación, clase de excremento y condiciones climáticas. Sin embargo, estudios han reflejado, para una gran

cantidad de especies coprófilas, una amplia adaptación y rango ecológico, y baja preferencia por un excremento en particular (Wicklow, 1975; Tisdall y Oades, 1982; Caretta *et al*., 1994).

Diversidad y presencia fúngica coprófila relacionada a las áreas de muestreo

La granja avícola de Moca presentó mayor presencia y diversidad de hongos coprófilos que la granja avícola de Lajas. Esto se pudo deber al sistema de recolección de las heces de las gallinas ponedoras. El sistema de recolección en la granja avícola de Moca es uno que permite más acumulación de heces en comparación con el sistema usado en la granja avícola de Lajas. Investigaciones han reflejado que una gran acumulación de heces favorece la presencia, supervivencia y crecimiento de hongos coprófilos debido al alto contenido de nutrientes que contienen (Mangiarotti *et al*., 1993; Caicedo *et al*., 1996; Curo *et al*., 2005; Romero, 2004). El alimento, la raza y la cantidad de gallinas eran iguales en ambas grajas avícolas. Sin embargo en este estudio, estadísticamente se encontró que esta diferencia no es significativa. Investigaciones han demostrado que a pesar de que se obtienen muestras de lugares que difieren climatológicamente, y si la diferencia no es extrema, existe uniformidad y similitud en la cantidad de la micobiota coprófila (Delgado *et al.*, 2002). Otra posible explicación para los resultados encontrados, es la reflejada por varios estudios en los que señalan que los hongos coprófilos han evolucionado, se han adaptado y pueden existir en un amplio rango ecológico (Wicklow, 1975; Tisdall y Oades, 1982; Caretta *et al.*, 1994). Entre las adaptaciones está el poder obtener nutrientes a partir de sustratos muy nitrificados, debido a que las heces de aves se caracterizan por contener altos niveles de nitrógeno (Ruiz *et al.*, 1981). También se debe tomar en cuenta que en ambas granjas avícolas, durante las dos épocas de estudio, las variables físico-

químicas analizadas en el excremento de la gallinas estuvieron dentro de los intervalos aceptables para la presencia fúngica (Herrera y Ulloa, 1990; Hawksworth, 1997; Bial, 2002).

Variabless físico-químicas analizadas en las heces de las gallinas ponedoras

El *pH* en ambas épocas y áreas de estudio fue ligeramente alcalino. Investigaciones indican que este excremento tiene un *pH* alcalino debido a las concentraciones de sales que contiene las dietas que se les da a estos animales y por la existencia de una alta población de bacterias que pueden alcalinizarlas (Romero, 2004; SAGARPA, 2002).

La *temperatura* fue de 27 a 35 °C, más alta de la que se promedia anualmente en la atmósfera de Puerto Rico que es de 22.7 a 29.4 °C (Santillana, 2002). Una posible explicación es que al acumularse las heces y éstas no ser movidas, es limitado el aire que penetra en ellas, permitiendo la acumulación de calor (SAGARPA, 2002).

El contenido de *humedad* fue mayor de 55%. Este resultado fue similar a los análisis realizados por Woynarovich (1979) y Schroeder (1980) en el que reportaron una humedad de 76%.

Hongos coprófilos recuperados

Doce géneros y dieciocho especies de hongos coprófilos fueron aislados de las heces de las gallinas ponedoras en las granjas avícolas bajo estudio. Las especies identificadas fueron *Cladosporium cladosporioides* (1.25%), *C. sphaerospermum* (1.87%), *Aspergillus niger* (0.62 %), *A. versicolor* (0.62%), *Penicillium frequentans* (0.62%), *P. spinulosum* (0.62%), *P. waksmani* (0.62%), *Curvularia brachyspora* (0.62 %), *C. lunata* (0.62%), *C. senegalensis* (0.62%), *Nigrospora oryzae* (0.62%), *Bipolaris spicifera* (0.62%), *Gonabotrytis* sp. (0.62%),

Tripospermum sp. (2.50%), *Coelomycete* (0.62%), *Rhodotorula mucilaginosa* (11.87%), *Rhodotorula* sp. (1.25%) *Candida famata* (3.12%), *C. parapsilosis* (9.37%), *C. guilliermondii* (1.25%), *C. albicans* (2.50%), *C. ciferrii* (3.12%), *Candida* sp. (50%) y *Cryptococcus* sp. (2.50%). Estos hongos son especies terrestres o habitantes de restos de vegetación u otra materia animal que fueron capaces de desarrollarse en las heces de gallinas. A los hongos que pueden desarrollarse sobre el excremento y habitar en otros sustratos son denominados como hongos coprófilos facultativos (Webster, 1970; Lundqvist, 1972; Delgado *et al*., 2002). En este estudio no se logró aislar ninguna especie exclusiva del ambiente coprófilo como se ha logrado aislar en otras investigaciones (Guarro, 1983; Barrasa y Moreno, 1984). En cambio, existen investigaciones en las que se han podido aislar hongos terrestres o habitantes de otros sustratos en ambientes coprófilos, siendo significativa su presencia (Mangiorotti *et al.,* 1993; Maldonado *et al.,* 2001; Delgado *et al.,* 2002; Piontelli *et al.,* 2006).

En ambas épocas e industrias avícolas bajo estudio el tipo de colonia que más se aisló fue la de levadura. Las levaduras se han aislado del excremento de una variedad de especies de aves, como pericos, pollos, loros y gorriones, siendo su presencia dominante (Littman y Borok, 1968; Bauwens *et al.,* 1986; Levitz, 1991). Contrario a los hongos mitospóricos que son uno de los menos numerosos encontrados sobre este tipo de sustrato (Delgado *et al.,* 2002). El haber aislado 160 colonias fúngicas demuestra que las heces de gallinas son un excelente sustrato y hábitat para varias especies de hongos. Romero (2004) señaló que en las heces de aves existe una alta proliferación de microorganismos y Delgado *et al.* (2002) indicó que sobre las heces se encuentran numerosas especies fúngicas.

Inicialmente algunos de los hongos aislados en este estudio (por ejemplo *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Cladosporium* sp.) se consideraban contaminantes o epífitos (Petrini, 1986). Sin

embargo, estos hongos se han aislado como coprófilos en varias investigaciones (Delgado *et al.*, 2002; Ulloa *et al*., 2006; Piontelli *et al.*, 2006). De acuerdo a Bell para hacer la identificación de los hongos filamentosos aún es usada la metodología de Saccardo. Se han sugerido modificaciones en el modelo de identificación, que ha llevado a la Conferencia Internacional de Micología que se efectuó en Canadá en 1969 a contratar varios micólogos taxónomos para discutir este tema. Los micólogos se reunieron en 1971 en Kendrick donde acordaron una restructuración del sistema de identificación de forma tal que el sistema de Saccardo sea gradualmente desplazado por nuevos esquemas de identificación. A pesar de estas reuniones el sistema de Saccardo es el más usado y completo hasta hoy en día. En el mismo se usan las características del cuerpo fructífero, y la forma, color y disposición de las conidias o esporas para determinar el género; mientras que las medidas de las esporas y cuerpo fructífero permiten la identificación de la especie (Bell, 1983; Pitt, 1991). Este fue el sistema utilizado en esta investigación para determinar las especies de hongos coprófilos filamentosos aisladas.

Las especies de *Aspergillus* sp. son muy comunes en diferentes sustratos y se han encontrado en heces de burro, oveja y sapo. La mayoría de sus especies producen toxinas y pueden ser oportunistas. En este estudio se aislaron dos especies de este género, *Aspergillus niger* y *Aspergillus versicolor*. Otros estudios han aislado a *A. niger* de heces de caballo, canario, lapa, loro, oveja, sapo, pavo, perro y vaquiro (Delgado *et al.*, 2002). Piontelli *et al.* (2006) lo aislaron en excremento de conejo durante meses cálidos; mientras que Mangioratti *et al.* (1993) lo aislaron de gallinas sanas y enfermas en una industria avícola en Italia. Su presencia en estas heces se debe a su adaptación de poder pasar por el canal digestivo de estos animales y depositarse en sus excrementos, además de que es una especie saprófita (Delgado y Piñeiro, 1997). Esta especie es un patógeno oportunista que puede causar condiciones pulmonares

(aspergilosis), alérgicas y sinusitis; es capaz de diseminarse al sistema nervioso central u otros órganos, como la piel y ojos, y afectarlos; es el principal causante de otomicosis (condición fúngica en el oído) en el ser humano; y en individuos inmunocomprometidos es letal (Lozada *et al.*, 1998; Fisher y Cook, 1998; Labarrere *et al*., 2003). Por otro lado, *A. versicolor* se ha logrado aislar de heces de conejo durante meses cálidos en un estudio realizado en un parque en Chile (Piontelli *et al.*, 2006), y de suelos de Costa Rica, Panamá, India, Egipto y Estados Unidos (Gilman, 1966). Esta especie es productora de micotoxinas (esterigmatocistinas) que interfieren en procesos biológicos del ser humano y animales, enfermándolos o matándolos, que se pueden adquirir mediante el consumo de alimentos contaminados con estas (Carrillo, 2003).

El género *Penicillium* sp. cuenta con especies coprófilas y con pocas que son patógenas. Este género se ha encontrado en el guano del murciélago (Ulloa *et al.*, 2006). Especies como *Penicillium claviforme* y *Penicillium digitatum*, se han aislado de heces de conejo, becerro, caballo, chivo y perro (Delgado *et al.*, 2002). En este estudio se aisló a *Penicillium frequentans*, *Penicillium spinulosum* y *Penicillium waksmani*. La especie *P. frequentans* es sinónimo de *P. glabrum* que anteriormente se ha reportado asociado a gallinas (Mangiarotii *et al.*, 1993). Esta especie se ha encontrado en suelos de Egipto, Canadá y Estados Unidos (Gilman, 1966). Por otra parte, *P. spinulosum* se ha aislado de suelos de Canadá y Austria; mientras que *P. waksmani* se ha aislado de suelos de Austria (Gilman, 1966). Esta investigación reporta a *P. spinulosum* y *P. waksmani* como especies coprófilas. Las especies de *Penicillium* sp. aisladas tienen un rol ecológico de descomposición y no se han reportado como patógenas. La diferencia entre especies recuperadas en este estudio en comparación con otras investigaciones podría estar relacionada a la localización específica del área de muestreo y al tipo de excremento analizado.

El género *Cladosporium* sp. tiene pocas especies patógenas para el ser humano, pero es uno de los principales contaminantes de alimentos con capacidad de crecer a 4 °C (Lozada *et al.*, 1998). Este género posee características que le permite subsistir y adaptarse a diferentes substratos en menor tiempo que otros hongos (Acevedo, 2008). En este estudio se aislaron las especies *Cladosporium cladosporioides* y *Cladosporium sphaerospermum*. La especie *C. cladosporioides* ha sido aislada anteriormente de heces de conejo durante meses fríos en un parque en Chile (Piontelli *et al*., 2006). Este hongo es uno patógeno oportunista común de varios sustratos que puede causar rinitis alérgicas (enfermedad nasal) y asma (Rappold, 2005). La otra especie, *C. sphaerospermum*, tiene una distribución mundial y es considerada un patógeno oportunista que puede causar reacciones alérgicas (Rappold, 2005). La literatura realizada para esta investigación no ha reportado esta especie como coprófila, pero debido a la capacidad de adaptación de este género a diferentes sustratos, era de esperarse que algunas de sus especies habitaran en ambientes coprófilos.

El género *Curvularia* sp. es un género que principalmente se ha asociado a tejidos de plantas, pero también contiene especies saprófitas y parásitas del ser humano (Barnet y Hunter, 1998). En este estudio se reportan como especies coprófilas a *Curvularia lunata, Curvularia senegalensis* y *Curvularia brachyspora.* La especie *C. lunata* en ocasiones actúa como fitopatógena de cultivos agrícolas como el maíz, guineo, plátano y arroz; mientras que *C. brachyspora* se ha reportado como endófito de yerbas marinas (Urdaneta *et al.*, 2002). Las especies *C. lunata* y *C. senegalensis* se han reportado como causantes de faohifomicosis (enfermedades subcutáneas), micetomas (enfermedad de aspecto tumoral en la piel) y queratitis (inflamación en la córnea del ojo) (Lozada *et al.*, 1998). Debido a la diversidad de ambientes,

terrestres y marinos, que *Curvularia* sp. se ha asociado podríamos especular que no hay especificidad por un sustrato en particular.

El género *Nigrospora* sp. se caracteriza por ser saprófito ásipar de plantas y raramente causa infecciones en el ser humano. Sólo se ha reportado a *Nigrospora sphaerica* afectando las fosas nasales de pacientes con leucemia (Lozada *et al*., 1998). En este estudio se aisló a *Nigrospora oryzae* como coprófila y se había aislado anteriormente como saprófita en suelos de Japón (Watanabe, 2002). El género *Bipolaris* sp. se ha encontrado como saprófito de suelos y algunas especies se han reportado como patógenas oportunistas (Fisher y Cook, 1998). En este estudio se aisló como coprófila a *Bipolaris spicifera* la cual es capaz de producir queratitis micóticas, úlceras cutáneas, encefalitis y sinusitis (Lozada *et al*., 1998). El género *Tripospermum* sp. se ha reportado como saprófito de suelos (Barnet y Hunter, 1998). Este género no es muy común en el ambiente, sin embargo en este estudio fue uno de los dominantes dentro de los hongos filamentosos. El haber aislado a *N. oryzae*, *B. spicifera* y a *Tripospermum* sp. pudo implicar una adaptación de su estado saprofítico.

El género *Gonabotrytis* sp. se ha reportado como saprófito de suelos y parásito de otros hongos (Barnet y Hunter, 1998). Su posible hallazgo en este ambiente coprófilo pudo deberse a una adaptación saprofítica o a que estaba parasitando a otros hongos coprófilos de las heces de las gallinas. En este estudio también se aisló un *Coelomycete*, al igual que en el estudio de Ulloa *et al.* (2006) donde a partir de excretas de gallinas se pudo aislar al coelomycete *Phoma* sp. Su identificación a género y especie resultó difícil por la similaridad de éste con varios géneros dentro del mismo grupo. Se sabe que las características que presentan los Coelomycetes en medios de cultivo no son fácilmente distinguibles, haciéndolos uno de los grupos más problemáticos para identificar (Bills, 1996). Gamboa y Bayman (2001) sugieren la combinación

de técnicas tradicionales con los análisis moleculares para la adecuada identificación de estos hongos.

El género *Candida* sp. tiene una amplia distribución en la naturaleza, cuenta con especies que forman parte de la flora normal del cuerpo humano y con habitantes de ambientes coprófilos. Se han descrito aproximadamente 80 especies de las cuales al menos siete causan enfermedades en los seres humanos (Lozada *et al.*, 1998). Mangiarotti *et al*. (1993) aislaron a *C. famata* y *C. guilliermondii* de las heces de gallinas sanas, y a *C. albicans* y *C. pseudotropicalis* de las heces de gallinas enfermas en una industria avícola en Italia. Por otro lado Maldonado *et al*. (2001) aislaron a *C. holmii, C. curvata, C. globosa, C. famata, C. norvegica* y *C. colliculosa* de excretas de palomas en las paredes y rampas de acceso de un centro hospitalario de la ciudad de Caracas, Venezuela. Por último, Ulloa *et al.* (2006) aislaron a *C. catenulata, C. ciferrii, C. famata* y *C. guilliermondii* del guano del murciélago, y a *C. albicans, C. catenulata, C. famata* y *C. tropicales* en excretas de aves de corral. En este estudio se aislaron a *C. albicans, C. parapsilosis, C. guilliermondii, C. famata, C. ciferrii* y otras *Candida* sp. que no se les pudo determinar la especie. La especie *C. albicans* es la levadura más frecuente y virulenta en el ser humano. Se encuentra como flora normal (endosaprófito) del tubo digestivo de mamíferos y aves, por lo que esto podría explicar su presencia en las heces. Se relaciona con condiciones como la candidiasis (enfermedad micótica en la piel, las mucosas y los órganos internos), vaginitis y endocarditis (Lozada *et al.*, 1998). Esta levadura se ha aislado anteriormente en heces de gallinas (Mangiarotti *et al*., 1993; Ulloa *et al.*, 2006). La levadura *C. parapsilosis* está presente en la mucosa vaginal y en otros sustratos ambientales. Ésta se ha observado como causante de candidiasis, endocarditis, vaginitis, otomicosis, fungemia (presencia fúngica en la sangre) y de infecciones del tracto urinario principalmente en personas inmunodeficientes

(Fisher y Cook, 1998). En la literatura revisaada para esta investigación no se encontró a esta especie habitando en heces, pero su aislación en este estudio puede implicar una adaptación de su estado saprofítico. La especie *C. guilliermondii* se ha aislado de la piel, agua de mar, avispas, pescado, cerveza y heces de animales. Esta levadura es causante de oniquia (infección en la raíz de la uña), endocarditis y candidiasis cutánea (Lozada *et al.*, 1998). Ulloa *et al.* (2006) la aislaron del guano del murciélago y Mangiarotti *et al*. (1993) de las excretas de gallinas. La levadura *C. famata* es bien común en diversos sustratos del ambiente y raramente se ha encontrado en la piel causando candidiasis cutánea (Fisher y Cook, 1998). Se ha aislado de excretas de palomas, gallinas y murciélagos (Mangiarotti *et al*., 1993; Maldonado *et al*., 2001; Ulloa *et al.*, 2006). La especie *C. ciferrii* se ha aislado del suelo y fuentes animales. Se ha reportado como causante de onicomicosis (infección en la uña) y empeorando el cuadro clínico de pacientes inmunodeficientes (García-Martos *et al*., 2004). Ulloa *et al.* (2006) la aislaron en excretas de aves y guano de murciélago.

Las *Rhodotorulas* sp. son levaduras que se pueden encontrar en la piel, esputo, suelo, agua, jugos de frutas, productos lácteos y excretas de varios animales (Lozada *et al*., 1998; Cure y Cardona, 2001). En este estudio se aislaron *Rhodotorulas* sp. que no se les pudo determinar la especie y a *Rhodotorula mucilaginosa* la cual es una levadura que puede causar fungemia y meningitis (El-Tahawy *et al.*, 1999). También se aisló a *Cryptococcus* sp., género que cuenta con 19 especies conocidas (Arguero *et al*., 1999). Investigaciones han mostrado la presencia de otras especies de *Cryptococcus* sp. diferentes a *C. neoformans* en excretas, suelos contaminados con excrementos, aire de palomares, hojas, flores y polen de plantas ornamentales como: eucalipto, pino, acacia, jacarandá y tilo (Colom *et al.*, 1997; Rivas *et al.*, 1999; Bernardo *et al*., 2001; Maldona, 2002; Curo *et al.*, 2005). En un estudio realizado en las afueras de un centro

hospitalario de la ciudad de Caracas en Venezuela se aisló a *C. uniguttulatus*, *C. laurenttii* y *C. albidus* de excretas de palomas (Maldonado *et al.*, 2001). También Ulloa *et al*. (2006) aislaron a *C. albidus* de excretas de aves y Mangiarotti *et al*. (1993) aislaron a *C. laurentii* en heces de gallinas sanas y enfermas de una industria avícola en Italia. El aislar a *Rhodotorula* sp. y *Cryptococcus* sp. del excremento de gallinas ponedoras se debe a que estas levaduras aprovechan el ambiente salino, alcalino y rico en nitrógeno que caracterizan a estas heces y que son importantes para su supervivencia (Rippon, 1982).

Los seres humanos son afectados por los hongos de diversas formas; reacciones alérgicas (rinitis alérgicas), condiciones pulmonares (asma, pneumonitis hipersensitiva), infecciones (crecimientos de los hongos en la superficie y dentro del cuerpo) y respuestas tóxicas (micotoxinas) (Górny *et al*., 2002). Debido a los hongos aislados en esta investigación, se determina que los desechos fecales de las gallinas ponedoras constituyen un ambiente en el que se encuentran hongos filamentosos y levaduriformes con capacidad patogénica, representando una fuente de infección para las aves, visitantes, consumidores y el personal de las granjas avícolas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación revelan lo siguiente:

- Ratifican que las heces de gallinas son un sustrato orgánico para el crecimiento de varias especies fúngicas, entre las que se encuentran especies patógenas para el ser humano.

- Las especies *Penicillium spinulosum*, *P. waksmani*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Curvularia lunata*, *C. senegalensis*, *C. brachyspora*, *Nigrospora. oryzae*, *Bipolaris spicifera*, *Tripospermum* sp., *Gonabotrytis* sp. y *Candida parapsilosis* se reportan como coprófilas.

- La prueba de *t independiente* demostró que variables físico-químicas en las heces de gallinas ponedoras difieren por época del año y lugar muestreado.

- La prueba del Chi χ^2 demostró que la micoflora coprófila (presencia y diversidad) no fue afectada por la época del año y el lugar de muestreo.

RECOMENDACIONES

Luego de realizar este estudio y analizar los resultados se recomienda:

- Realizar un estudio similar en diferentes granjas avícolas alrededor de la Isla para determinar si los hongos coprófilos siguen algún patrón en específico.

- Aislar hongos coprófilos de otras aves o animales que interactúan constantemente con el ser humano para determinar si hay especificidad de estos hongos hacia algún organismo en particular.

- Determinar el comportamiento, roles e interacción de los hongos coprófilos con el ser humano.

- Adoptar el uso de técnicas moleculares en combinación con las técnicas tradicionales para identificar adecuadamente los hongos coprófilos que presentan problemas.

- Para disminuir la presencia de hongos coprófilos patógenos en las granjas avícolas, adoptar medidas periódicas de limpieza y evitar la acumulación de las heces de gallinas por el riesgo que implica su presencia.

- Promover el uso de las heces de gallinas como energía o abono orgánico en la agricultura y otras industrias, para de esta forma convertir una fuente de contaminación en un recurso biológico.

LITERATURA CITADA

Acevedo, J. O. 2008. Distribución temporal de hongos miceliales en una zona industrial en Mayagüez, Puerto Rico. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R., 85 pp.

Aguirre, E. 1959. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* del guano de murciélago en cuevas del noroeste de México. Gaceta Médica de México. 89:243-253.

Aguirre, E. y M. Ulloa. 1983. Primer registro en México sobre la sucesión de hongos en el estiércol. Sociedad Biológica Mexicana. 18:76-88.

Ajello, L. 1994. Relationship of *Histoplasma capsulatum* to avian habitats. Public Health Reports. 79:266-270.

Arguero, B. L., D. G. Garza, V. U. Flores y R. A. O. Cevantes. 1999. Aislamiento y caracterización de *Cryptococcus neoformans var. gatti* a partir de muestras de *Eucalyptus camaldulensis* en la ciudad de México. Revista Iberoamericana de Micología. 16:40-42.

Barnett, H. L. y B. B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi, fourth edition. Macmillan Publishing Company, New York, 218 pp.

Barr, M. E. 2000. Notes on coprophilous bitunicate ascomycetes. Mycotaxon. 76:105-112.

Barrasa, J. M. y G. Moreno. 1984. Hongos coprófilos de España III. Anales Jardín Botánico, Madrid. 41(1):3-17.

Bauwens, L., D. Swinne, C. De Vroey y W. Meurichy. 1986. Isolation of *Cryptococcus neoformans var. neoformans* in the aviaries of the Antwerp Zoological Garden. Mykosen. 29:291-294.

Beebe, W. 1936. Pheasants-Their Lives and Homes, second edition. Doubleday, Doran & Co. Inc., New York, 66 pp.

Bell, A. 1983. Dung fungi and illustrated guide to coprophilous fungi in New York. (fourth edition). Victoria University Press, 88 pp.

Bell, A. 2005. An illustrated guide to the coprophilous Ascomycetes of Australia. CBS, Utrecht, The Notherland, 173 pp.

Bell, A. y D. P. Mahoney. 1995. Coprophilous fungi in New Zealand. Podospora species with swollen aglutinated perithecial hairs. Mycology. 87:375-396.

Bernardo, F., M. Martins y M. Lígia. 2001. Fuentes urbanas de *Cryptococcus* sp. Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias. 96(539):157-160.

Bial, A. 2002. El reino de los hongos. Revista Iberoamericana de Micología. 1-4.

Bills, G. F. 1996. Isolation and analysis of fungal communities from woody plants. En: S.C. Redlin y L. M. Carris (eds.), Endophytic fungi in grasses and woody plants, pp. 31-65. APS Press, Minnesota.

Brissio, P. A. 2005. Evaluación preliminar del estado de contaminación en suelos de la Provincia del Neuquén donde se efectúan actividades de explotación hidrocarburífera. Tesis: Saneamiento y Protección Ambiental. Universidad Nacional del Comahue, Argentina. [Online] http://www.tesis.bioetica.org/pab7.htm.

Burney, D. A., G. S. Robinson y L. P. Burney. 2003. Sporomiella and the late Holocene extinctions in Madagascar. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 10800-10805.

Caicedo, L. D., M. I. Alvarez, C. E. Llanos y D. Molina. 1996. *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas del perímetro urbano de Cali. Colombia Médica. 27(3-4):106-109.

Caretta, G., A. M. Mangiarotti y E. Piontelli. 1994. Coprophilous fungi on horse, goat and sheep dung from Lombardia, Italy. Micología Italiana. 23:11-20.

Carrillo, L. 2003. Microbiología Agrícola. Capítulo 6. Smith JE, Henderson RS, eds. CRC Press, Boca Ratón, 245 pp.

Castañon-Olivares, L. R. y R. López-Martínez. 1994. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columbia livia*) droppings in Mexico City. Mycoses. 37:325-327.

Chaumeton, H. 1987. Guía de los hongos de Europa. [Online] http://www.mju.es/toxicologia/intoxicaciones/setas.htm

Chávez-Tapia, C. B, R. Vargas-Yáñez y G. Rodríguez-Arellanes. 1998. El murciélago como reservorio y responsable de la dispersión de *Histoplasma capsulatum* en la naturaleza. II. Papel de los marcadores moleculares del hongo aislado de murciélagos infectados. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México. 11:187-191.

Colom, M. F., M. Alberdi, I. Meseguer y J. Torres. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en muestras del medio ambiente de Alicante. Revista Iberoamericana de Micología. 14(1):63-64.

Crawford, R. D. 1990. Chapter 1. Origin and history of poultry species. Chapter 2. Poultry genetic resources: evolution, diversity and conservation. In: Crawford RD (Editor), Poultry Breeding and Genetics. Elsevier Science Publisher, Amsterdam. Publisher ISBN 0-444-88557-9.

Cure, N. R. y A. F. Z. Cardona. 2001. Aislamiento de *Rhodotorula* sp. en un paciente crítico enfermo. Infectro. 5:179-182.

Curo, M., M. Salinas y J. Casquero. 2005. *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas, suelo y aire de los palomares del perímetro urbano de Ica. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 22(2):262-266.

Currah, R. S. 1985. Taxonomy of the Onygenales: Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae. Mycotaxon. 24:1-216.

Davis, O. K. 1987. "Spores of the dung fungus *Sporormiella*: increased abundance in historic sediments and before Pleistocene megafaunal extinction". Quaternary Research. 28:290294.

De Hoog, G. S., H. Gene y M. J. Figueras. 2000. Atlas of clinical fungi, second edition. CBS, Nederland. University Rovira Virgili Reus, Spain. 1126 pp.

Delgado, A. y A. Piñeiro. 1997. Avance preliminar de clasificación taxonómica de hongos coprófilos. XV Congreso Nacional de Fitopatlogía. 23-27 Noviembre. Maracaibo, Venezuela, 50 pp.

Delgado, A. A., C. A. Piñeiro y G. L. Urdaneta. 2002. Hongos coprófilos del estado de Zulia. Venezuela. Clases: Plectomycetes y Discomycetes. División Ascomycota. Revista Científica FCV-Luz. 11:297-305.

Domsch, K. H., W. Gams y T. H. Anderson. 1993. Compendium of soil fungi. Volumen 2. IHW-Verlang Eching, 1264 pp.

Ellis, D. y T. J. Pteiffer. 1990. Natural habitat *Cryptococcus neoformans var. gattii*. Journal Clinical of Microbiology. 28:1642-1644.

Elmer, W., M. D. Koneman y D. Glenn. 1993. Enfermedades Micóticas. En: Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por Laboratorio, Director J. B. Henry, novena edición, pp. 1186-1187. Editorial Madrid Masson Salvat.

El-Tahawy, A. T. A. y R. M. F. Khalaf. 1999. *Rhodotorula rubra* fungemia in an immunocompromised patient. Annals of Saudi Medicine. 19(6): 533-535.

Erikson, O. E. 2006. Outline of Ascomycota. Myconet. 12:1-82.

Fitzpatrick, T. y R. Hay. 1999. Dermatología en Medicina General, quinta edición, pp 2518-2522. Editorial Panamericana.

Fisher, F. y N. B. Cook. 1998. Fundamentals of Diagnostic Micology. W. B. Saunders Company, United States, 352 pp.

Fumihito, A., T. Miyake, M. Takada, R. Shingu, T. Endo, T. Gojobori, N. Kondo y S. Ohno. 1996. Monophyletic Origin and Unique Dispersal Patterns of Domestic Fowls. Proceedings of the National Academy of Science. (93)13:6792-6795.

Florez-Margez, J. P., R. P. Fynn, W. C. Lindemann y M. Remmenga. 2002. Total nitrogen content of dairy manures in New Mexico. Agricultural experimental station bulletin, pp. 785. Colege of Agriculture and Home Economics, NMSU.

Gamboa, M. A. y P. Bayman. 2001. Communities of fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). Biotropica. 33(2): 352-360.

Gamundi, J. I., D. W. Minter, I. A. Romero, V. A. Barrera, A. L. Gaiotti, M. I. Messuti y M. Stecconi. 2004. Checklist of the discomycetes (Fungi) of Patagonia, Tierra de Fuego and Adjacent Antartic areas. Darwiniana. 42:63-164.

García-Martos, P., J. Ruiz-Aragón, L. García-Agudo, A. Saldarreaga, M. C. Lozano y P. Marín. Aislamiento de *Candida ciferrii* en un paciente inmunodeficiente. Revista Iberoamericana de Micología. 21:85-86.

Gautier, Z. 2002. « Gallus gallus » (On-line), Animal Diversity Web. http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Gallus_gallus.html.

Gilberstone, C. B., F. A. Norstadt y A. C. Mathers. 1979. Animal Waste Utilization on Cropland and Paustureland. A Manual for Evaluating Agronomic and Environmental Effects. USDA Science and Education Administrtation.

Gilman, J. C. 1966. A Manual of Soil Fungi, second edition, pp 6657-6663. The Iowa State University Press.

Gómez, L. J. 1990. Apuntes para una historia de la producción animal. Universidad de Antioquia, Medellín, 122 pp.

Górny, R. L., T. Reponen, K. Willeke, D. Schmechel, E. Robine, M. Boissier y S. A. Grinshpun. 2002. Fungal fragments as indoor air biocontaminants. Applied and Environmental Microbiology. 68(7):3522–3531.

Guarro, A. J. 1983. Hongos coprófilos aislados en Cataluña. Ascomycetes. Anales Jardín Botánico, Madrid. 39(2):229-245.

Guarro, J., S. K. Abdullah, J. Gene y A. H. Al-Saadoon. 1997. A new species of Preussia from submerged plant debris. Mycological Research. 101:305-308.

Guzmán, G. y A. M. Pérez-Patraca. 1972. Las especies conocidas del género *Paneolus* en México. Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología. 6:17-53.

Harper, J. E. y J. Webster. 1964. An experimental analysis of the coprophilous fungus succession. Transactions of the British Mycological Society. 47:511-530.

Hawksworth, D. L. 1997. Fungi and international biodiversity initiatives. Biodiversity and Conservation. 6:661-668.

Hermosilla, G. D. 2000. Capítulo 19 – Micología. En: Biología General de los Hongos. pp. 301-309.

Herrero, T. y M. Ulloa. 1990. El Reino de los Hongos. UNAM/Fondo de Cultura Económica, México, D. F., 552 pp.

Hudson, H. J. 1978. The ecology of fungi on plant remains above the soil. New Phytologist, Oxford. 67:187-217.

Hufman, T. y C. Dreyer. 2000. "Pollen analysis of Iron Age cow dung in southern Africa". Vegetation History and Aschaeobotany. 9:239-249.

Johnsgard P. A. 1986. The Pheasants of the World, pp. 3-280. Oxford University. Press, New York.

Kern, M. E. y K. S. Blevins. 1997. Medical Mycology, A Self Instructional Text. F. A. Davis Company, Philadelphia, 231 pp.

Kimbrough, J. W. 1982. The Discomycetes, pp. 231-242. In Encyclopedia of Taxonomy and Classification of Living Organisms. McGraw-Hill Book Company, New York.

Kimbrough, J. W., E. R. Luck-Allen y R. F. Cain. 1969. Iodophanus, the Pezizaceae segregate of Ascophanus (Pezizales). American Journal of Botany. 56:1187-1202.

Kirk, J. K. 1967. Statements of general policy or interpretation. Federal Register 32: September, 2.

Krug, J. C. y R. S. Khan. 1989. New records and new species of *Podospora* from East Africa. Canadian Journal of Botany. 67:1174-1182.

Labarrere, N., A. Gómez, I. Ávila, M. E. Guevara y B. Fernández. 2003. Riesgos biológicos en ambientes confinados. Revista Cubana de Salud y Trabajo. 4(1-2): 4-7.

Lazo, W. 1979. Hongos coprófilos de Chile. Archivos de Biología y Medicina Experimentales. 12:637.

Levitz, S. M. 1991. The ecology of *Crytococcus neoformans* and the epidemiology of criptococosis. Review Infectious Diseases. 13:1163-1169.

Limbery, P. 2002. "Hay una historia de maltrato de las aves y peligros para la salud de las personas y el medioambiente detrás de cada caja de huevos" (On-line). http://www.vegansociety.com.

Lincoff, G. H. 1981. Field guide to North American Mushrooms. Knopf Incorporation, New York, 926 pp.

Littman, M. L. y R. Borok. 1968. Relation of the pigeon to criptococosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. Mycopathol Mycology Applications. 35:922-933.

Lorenzo, L. A. y M. Havrylenko. 2002. *Podospora perplexens* (Sordariales, Ascomycota), una especie coprófila que crece sobre suelo quemado. Botánica Argentina. 37(3-4):157-160.

López-Martínez, R. y L. R. Castañon-Olivares. 1995. Isolation of *Cryptococcus neoformans var. neoformans* from bird droppings, fruits and vegetables in Mexico City. Micopathologia. 129:25-28.

Lozada, C., B. Ortiz y C. Betancourt. 1998. Introducción a la Micología Médica. Imprenta Universitaria Recinto Universitario de Mayagüez, Mayagüez P. R., 227 pp.

Lundqvist, N. 1972. Nordic Sordariaceae Symbolae. Botanicae Upsalienses XX. 20:1-374.

Maldona, B. 2002. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* de excretas de palomas en un Hospital Público. En: Libro de Resúmenes del IV Congreso Latinoamericano de Micología, 449 pp.

Maldonado, L. B., B. A. Sosa y R. Mizrachi. 2001. Aislamiento de levaduras del género *Cryptococcu*s de excretas de palomas. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 21(2):29-30.

Mangiarotti, A. M., G. Caretta, C. De Luca y E. L. Piontelli. 1993. Hongos aislados del plumaje y excremento de gallinas en una industria avícola de Monferrato, Pavia Italia. Boletín Micológico. 8(1/2):8-91.

Mena, J. J. P. 2004. Taxonomía del complejo de *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* y *Exserohilum* en Cuba. Tesis de licenciatura en la Universidad de la Habana Cuba, 52 pp.

Mira, C. A., R. Anzola, A. Martínez, R. Linás, C. Valencia, A. Restrep. 1968. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de materiales contaminados con excretas de palomas en Medellín, Colombia. Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia.18:33-40.

Mirza, J. H. y R. F. Cain. 1969. Revision of the genus *Podospora*. Canadian Journal of Botany 47:1999-2048.

O'Hallorans, J. M. y M. A. Muñoz. 1997. *Uso de la gallinaza como fertilizante*. Integrando Ciencias Agrícolas y Medio Ambiente. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 1:20-26.

Ordoñez, N. y E. Castañeda. 1994. Serotipificación de aislamientos clínicos y del medio ambiente de *Cryptococcus neoformans* en Colombia. Biomédica. 14:131-139.

Ortiz, J. 2000. ¿Un mal necesario? El despique en Gallinas de Postura. Primer Informe de la Cadena Avícola, Departamento Técnico de Santa Cruz. http://www.engormix.com/_un_mal_necesario_s_articulos_190_AVG.htm

Patiño, V. M. 1963. Plantas cultivadas y animales domésticas en América equinoccial. Imprenta Departamental, Cali, 75 pp.

Petrini, O. 1986. Taxonomy fungi of aerial plant tissues. En: N. J. Fonema and J. Van den Heuvel (eds.), Microbiology of the phyllosphere, pp. 175-187. Cambridge University Press, Cambridge.

Piontelli, E. y A. Grixolli. 1997. Microhongos de la Patagonia Chilena: algunos Ascomycetes coprófilos. Boletín Micológico. 12:13-24.

Piontelli, E., M. A. Toro y G. Caretta. 1981. Coprophilous fungi of the horse. Mycopathologia. 74:89-105.

Piontelli, E., R. Cruz y A. Toro. 2006. Coprophilous fungal community of wild rabbit in a park of hospital (Chile): a taxonomic approach. Boletín Micológico. 21:1-17.

Pitt, J. A. 1991. Laboratory Guide Common *Penicillium* Species. Common Wealth Scient and Industrial Research. Organization Division Food Processing, 183 pp.

Pteiffer, T. J. y D. Ellis. 1991. Emviromental isolation of *Cryptococcus neoformans var. gattii* from California. Journal of Infection Diseases. 163: 929-930.

Quicaño, L., S. Romero y J. Casquero. 1999. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en heces, suelo y aire de viviendas con palomas domésticas *Columbia livia* – Ayacucho. En: Libro de Resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Micología, pp. 101. Sociedad Latinoamericana de Micología, Venezuela.

Quintero, E., E. Castañeda y A. Ruiz. 2005. Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca-Colombia. Revista Iberoamericana de Micología. 22:93-98.

Rappold, D. 2005. Annual indoor air quality assessment Lewiston-Porter School District, Primary School. Building Science Investigations, Inc. 1-24.

Rayner, A. D. M. y N. K. Todd. 1979. Population and Community Structure and Dynamics of Fungi in Decaying Wood. In H. W. Woolhouse (ed.), Advances in Botanical Research, pp. 380-381. Academic Press: London, U. K.

Ravner, A., H. Covas y C. De Sanzo. 2009. Tipos y razas de gallinas. Autosuficiencia. http://www.autosuficiencia.com

Richardson, M. J. 1972. Coprophilous Ascomycetes on different dung types. Transactions of the British Mycological Society. 59:37-48.

Richardson, M. J. 2001. Diversity and occurrence of coprophilous fungi. Mycological Research. 105:387-402.

Riddell, R. W. 1950. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. Mycology. 42:265-270.

Rippon, J. W. 1982. Medical Micology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. pp. 532-542. W. B. Saunders Company, Philadelphia.

Rivas, F., M. C. De Martin y V. Rojas. 1999. Primer aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de suelos en Panamá. Revista Iberoamericana de Micología. 24(1):4-6.

Rogers, J. D. 1979. The Xylariaceae: systematic, biological and evolutionary aspects. Mycologia. 71: 1-42.

Romero, P. L. A. 2004. Aislamiento de la levadura *Cryptococcus neoformans var. neoformans* y *var. gattii*, serotipo C en el departamento del Atlántico, Colombia. Tesis M.S. Universidad d Puerto Rico, Mayaguez, P.R., 98 pp.

Rosado, A. A. 1999. Mejoramiento de avicultura familiar en México. Acontecer Avícola VI edición. 35:62.

Rubio, E., A. Suárez, M. A. Miranda y J. Linde. 1999. Catálogo provisional de los macromicetos (setas) de Asturias. 1:1-216.

Ruiz, A., R. A. Fromtling y G. S. Bulmer. 1981. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site. Infection and Immunity. 31: 560-563.

Sabban, F., J. W. Bratzle, T. A. Long, L. H. Frear y R. F. Gentry. 1968. Value of processed poultry waste as affected for rumiants. Journal Animal Science. 107-111.

Sáenz, C. y M. Gutiérrez. 2006. Esporas en la comunidad de Madrid. Instituto de Salud Pública. 83:1-51.

SAGARPA. 2002. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuario estadístico de la producción agropecuaria. Delegación regional de la SAGARPA, Lerdo Dgo.

San Martin, F., P. Lavin y E. Pérez-Silvia. 1998. Xylariaceae fimícolas: *Xylaria equina* y nuevos registros mexicanos de *Xylaria pileiformis* y *Poronia erici*. Acta Botánica Mexicana.42:15-23.

Santillana. 2002. Historia y geografía de Puerto Rico. Serie Siglo XXI. Ediciones Santillana, Inc. Guaynabo, Puerto Rico, 327 pp.

Schroeder, D. 1980. Investigations on *Oberera erythrocephala* (Schrank) (Coleoptera: Cerambycidae), a possible biological control agent of leafy spurge, *Euphorbia* spp. (Euphorbiaceae) in Canada. Zeitschrift Angewandte Entomologie. 90:237-254.

Shinner, F., R. Ohlinger, E. Kandeler y R. Masgesin. 1996. Methods in soil biology. XI edition. Germany: Spring Verlag Eds., Berlín, 426 pp.

Sigler, L. y P. E. Verweij. 2003. *Aspergillus*, *Fusarium* and other opportunistic moniliaceous fungi. In: Manual of clinical microbiology 8th Ed (Murray et al, eds), pp. 1726-1760. American Society for Microbiology, Washington.

Sivanesan, A. 1987. Graminicolous Species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their Teleomorphs. Mycological Paper. 158:106-157.

Smith, L. W. y W. Weeler. 1979. Nutrional and economic value of animal excreta. Journal Animal Science. 48:144-456.

Stchigel, A. M., M. Calduch y L. Zaror. 2002. A new species of *Podospora* from soil of Chile. Mycology. 94:554-558.

Taiganides, E. P. 1978. Principles and Techniques of animal waste management and utilization. FAO Soils, Bull. 36:341–362.

Taylor, M. L., C. Toriello, A. Pérez-Mejía, M. A. Martínez, M. R. Reyes-Montes, L. Espinosa Avila y C. Chávez-Tapia. 1994. Histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico: A biological approach. Revista Mexicana de Micología. 10:49-62.

Taylor, M. L., C. B. Chávez-Tapia y M. R. Reyes-Montes. 2000. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. Fungal Genetics and Biology. 30:207-212.

Tisdall, J. M. y J. M. Oades. 1982. Organic matter and waterstable aggregates in soils. Journal of Soil Science. 33:141-163.

Ulloa, M., P. Lappe, S. Aguilar, H. Park, A. Pérez-Mejía, C. Toriello y M. L. Taylor. 2006. Contribution to the study of the mycobiota present in the natural habitats of *Histoplasma capsulatum*: an integrative study in Guerrero, Mexico. Revista Mexicana de Biodiversidad. 77: 153-168.

Urdaneta, L. M., A. E. Delgado, L. Sosa y A. Piňeiro. 2002. Microbiota en plátano Harton, en el municipio Francisco Javier Pulgar del estado Zulia, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía. 19:95-108.

Van Geel, B., G. R. Coope y T. Van Der Hammen. 1989. "Palaeoecology and stratigraphy of the Lateglacial type section at Usselo (The Netherlands)". Review of Palaeobotany and Palynology. 60:25-129.

Walker, J. K. 1999. Suitability of composted dairy manure for plant production in New Mexico. Master's thesis. New Mexico State University, Las Cruces, 120 pp.

Watanabe, T. 2002. Pictoral atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. CRC Press LLC, United States, 324 pp.

Webster, J. 1970. Presidential Address. Coprophilous fungi. Transactions of the British Mycological Society. 54:161-180.

Wicklow, D. T. 1975. Relationship between coprophilous fungi and fecal substrates in a Colorado grassland. Mycology. 67:63-64.

Wicklow, D. T. y V. Moore. 1974. Effect of incubation temperature on the coprophilous fungus succession. Transactions of the British Mycological Society. 62:411-415.

Woynarovich, E. 1979. The feasibility of combining animal husbandry with fish farming, with special reference to duck and pig production, pp. 203–208. In T.V.R. Pillay and W.A.

Dill (Editors), Advances in aquaculture. Fishing News Books Ltd., Farnham, Surrey, England.

Yocom, D. H. y Wicklow, D. T. 1980. Community differentiations along a dune succession: an experimental approach with coprophilous fungi. Ecology. 61:868-880.

APÉNDICE A

Heces de gallinas ponedoras

APÉNDICE B

Gallinas ponedoras *Rhode Island*

APÉNDICE C

Resultados de las pruebas del Chi χ^2 para la presencia y diversidad de hongos por áreas y temporadas de muestreo.

I. Prueba del Chi χ^2 para la presencia de hongos en las temporadas de muestreo: Granja Avícola de Moca.

Tablas de contingencia
Frecuencias: Cantidad

Frecuencias absolutas
En columnas: Muestreos

Temporada	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Total
Alta precipitación	31	12	12	6	61
Baja precipitación	8	10	9	4	31
Total	39	22	21	10	92

Frecuencias esperadas
En columnas: Muestreos

Temporada	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Total
Alta precipitación	25.86	14.59	13.92	6.63	61.00
Baja precipitación	13.14	7.41	7.08	3.37	31.00
Total	39.00	22.00	21.00	10.00	92.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	5.36	3	0.1471
Chi Cuadrado MV-G2	5.54	3	0.1364
Coef.Conting.Cramer	0.17		
Coef.Conting.Pearson	0.23		

II. Prueba del Chi χ^2 para la presencia de hongos en las temporadas de muestreo: Granja Avícola de Lajas.

Tablas de contingencia
Frecuencias: Cantidad

Frecuencias absolutas
En columnas: Muestreos

Temporada	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Total
Alta precipitación	24	9	8	10	51
Baja precipitación	3	6	4	4	17
Total	27	15	12	14	68

Frecuencias esperadas
En columnas: Muestreos

Temporada	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Total
Alta precipitación	20.25	11.25	9.00	10.50	51.00
Baja precipitación	6.75	3.75	3.00	3.50	17.00
Total	27.00	15.00	12.00	14.00	68.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	5.12	3	0.1634
Chi Cuadrado MV-G2	5.42	3	0.1434
Coef.Conting.Cramer	0.19		
Coef.Conting.Pearson	0.26		

III. Prueba del Chi χ^2 para la presencia de hongos en las temporadas de muestreo.

Tablas de contingencia
Frecuencias: Cantidad

Frecuencias absolutas
En columnas: Muestreos

Temporada	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	
Alta precipitación	31	24	12	9	
	Muestreo 5	Muestreo 6	Muestreo 7	Muestreo 8	Total
Alta precipitación	12	8	6	10	112
	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	
Baja precipitación	8	3	10	6	
	Muestreo 5	Muestreo 6	Muestreo 7	Muestreo 8	Total
Baja precipitación	9	4	4	4	48

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	11.68	7	0.1115
Chi Cuadrado MV-G2	12.38	7	0.0886
Coef.Conting.Cramer	0.19		
Coef.Conting.Pearson	0.26		

IV. Prueba del Chi χ^2 para la presencia de hongos en las áreas de muestreo: temporada de alta precipitación.

Tablas de contingencia
Frecuencias: Cantidad

Frecuencias absolutas
En columnas: Muestreos

Área de muestreo	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Total
Moca	31	12	12	6	61
Lajas	24	9	8	10	51
Total	55	21	20	16	112

Frecuencias esperadas
En columnas: Muestreos

Área de muestreo	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Total
Moca	29.96	11.44	10.89	8.71	61.00
Lajas	25.04	9.56	9.11	7.29	51.00
Total	55.00	21.00	20.00	16.00	112.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	2.24	3	0.5232
Chi Cuadrado MV-G2	2.25	3	0.5231
Coef.Conting.Cramer	0.10		
Coef.Conting.Pearson	0.14		

V. Prueba del Chi χ^2 para la presencia de hongos en las áreas de muestreo: temporada de baja precipitación.

Tablas de contingencia
Frecuencias: Cantidad

Frecuencias absolutas
En columnas: Muestreos

Área de muestreo	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Total
Moca	8	10	9	4	31
Lajas	3	6	4	4	17
Total	11	16	13	8	48

Frecuencias esperadas
En columnas: Muestreos

Área de muestreo	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Total
Moca	7.10	10.33	8.40	5.17	31.00
Lajas	3.90	5.67	4.60	2.83	17.00
Total	11.00	16.00	13.00	8.00	48.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	1.22	3	0.7492
Chi Cuadrado MV-G2	1.20	3	0.7532
Coef.Conting.Cramer	0.11		
Coef.Conting.Pearson	0.16		

VI. Prueba del Chi χ^2 para la presencia de hongos en las áreas de muestreo.

Tablas de contingencia
Frecuencias: Cantidad

Frecuencias absolutas
En columnas: Muestreos

Área de muestreo	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Muestreo 5
Moca	8	10	9	4	31
	Muestreo 6	Muestreo 7	Muestreo 8	Total	
Moca	12	12	6	92	
	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Muestreo 5
Lajas	3	6	4	4	24
	Muestreo 6	Muestreo 7	Muestreo 8	Total	
Lajas	9	8	10	68	

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	4.82	7	0.6815
Chi Cuadrado MV-G2	4.87	7	0.6760
Coef.Conting.Cramer	0.12		
Coef.Conting.Pearson	0.17		

VII. Prueba del Chi χ^2 para la diversidad de hongos en las temporadas de muestreo: Granja Avícola de Moca.

Tablas de contingencia
Frecuencias: Diversidad

Frecuencias absolutas
En columnas: Muestreos

Temporada	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Total
Alta precipitación	9	3	3	3	18
Baja precipitación	3	3	3	2	11
Total	12	6	6	5	29

Frecuencias esperadas
En columnas: Muestreos

Temporada	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Total
Alta precipitación	7.45	3.72	3.72	3.10	18.00
Baja precipitación	4.55	2.28	2.28	1.90	11.00
Total	12.00	6.00	6.00	5.00	29.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	1.60	3	0.6585
Chi Cuadrado MV-G2	1.63	3	0.6516
Coef.Conting.Cramer	0.17		
Coef.Conting.Pearson	0.23		

VIII. Prueba del Chi χ^2 para la diversidad de hongos en las temporadas de muestreo: Granja Avícola de Lajas.

Tablas de contingencia
Frecuencias: Diversidad

Frecuencias absolutas
En columnas: Muestreos

Temporada	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Total
Alta precipitación	5	1	1	2	9
Baja precipitación	1	2	1	2	6
Total	6	3	2	4	15

Frecuencias esperadas
En columnas: Muestreos

Temporada	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Total
Alta precipitación	3.60	1.80	1.20	2.40	9.00
Baja precipitación	2.40	1.20	0.80	1.60	6.00
Total	6.00	3.00	2.00	4.00	15.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	2.50	3	0.4753
Chi Cuadrado MV-G2	2.65	3	0.4494
Coef.Conting.Cramer	0.29		
Coef.Conting.Pearson	0.38		

IX. Prueba del Chi χ^2 para la diversidad de hongos en las temporadas de muestreo.

Tablas de contingencia
Frecuencias: Diversidad

Frecuencias absolutas
En columnas: Muestreos

Temporada	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	
Alta precipitación	9	3	3	3	
	Muestreo 5	Muestreo 6	Muestreo 7	Muestreo 8	Total
Alta precipitación	5	1	1	2	27
	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	
Baja precipitación	3	3	3	2	
	Muestreo 5	Muestreo 6	Muestreo 7	Muestreo 8	Total
Baja precipitación	1	2	1	2	17

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	4.14	7	0.7634
Chi Cuadrado MV-G2	4.30	7	0.7448
Coef.Conting.Cramer	0.22		
Coef.Conting.Pearson	0.29		

X. Prueba del Chi χ^2 para la diversidad de hongos en las áreas de muestreo: temporada de alta precipitación.

Tablas de contingencia
Frecuencias: Diversidad

Frecuencias absolutas
En columnas: Muestreos

Área de muestreo	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Total
Moca	9	3	3	3	18
Lajas	5	1	1	2	9
Total	14	4	4	5	27

Frecuencias esperadas
En columnas: Muestreos

Área de muestreo	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Total
Moca	9.33	2.67	2.67	3.33	18.00
Lajas	4.67	1.33	1.33	1.67	9.00
Total	14.00	4.00	4.00	5.00	27.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	0.39	3	0.9432
Chi Cuadrado MV-G2	0.40	3	0.9413
Coef.Conting.Cramer	0.08		
Coef.Conting.Pearson	0.12		

XI. Prueba del Chi χ^2 para la diversidad de hongos en las áreas de muetreo: temporada de baja precipitación.

Tablas de contingencia
Frecuencias: Diversidad

Frecuencias absolutas
En columnas: Muestreos

Área de muestreo	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Total
Moca	3	3	3	2	11
Lajas	1	2	1	2	6
Total	4	5	4	4	17

Frecuencias esperadas
En columnas: Muestreos

Área de muestreo	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Total
Moca	2.59	3.24	2.59	2.59	11.00
Lajas	1.41	1.76	1.41	1.41	6.00
Total	4.00	5.00	4.00	4.00	17.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	0.80	3	0.8498
Chi Cuadrado MV-G2	0.80	3	0.8490
Coef.Conting.Cramer	0.15		
Coef.Conting.Pearson	0.21		

XII. Prueba del Chi χ^2 para la diversidad de hongos en las áreas de muestreo.

Tablas de contingencia
Frecuencias: Diversidad

Frecuencias absolutas
En columnas: Muestreos

Área de muestreo	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Muestreo 5
Moca	3	3	3	2	9
	Muestreo 6	Muestreo 7	Muestreo 8	Total	
Moca	3	3	3	29	
	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Muestreo 5
Lajas	1	2	1	2	5
	Muestreo 6	Muestreo 7	Muestreo 8	Total	
Lajas	1	1	2	15	

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	1.21	7	0.9907
Chi Cuadrado MV-G2	1.21	7	0.9906
Coef.Conting.Cramer	0.12		
Coef.Conting.Pearson	0.16		

APÉNDICE D

Resultados de las *pruebas t independiente* para las variables físico-químicas analizadas a las heces de gallinas ponedoras.

I. Prueba de *t* del *pH* [H+] para las temporadas de muetreo en la Granja Avícola de Moca.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Temporada	pH [H+]	{Alta precipitación}	{Baja precipitación}	20	20	1.6E-08

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
1.5E-08	-7.2E-09	9.7E-09	0.00	0.00	0.0011

T	gl	p	prueba
0.30	27	0.7631	Bilateral

II. Prueba de *t* del *pH* [H+] para las temporadas de muetreo en la Granja Avícola de Lajas.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Temporada	pH [H+]	{Alta precipitación}	{Baja precipitación}	20	20	1.6E-08

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
9.1E-09	2.1E-09	1.1E-08	0.00	0.00	0.9105

T	gl	p	prueba
2.94	38	0.0655	Bilateral

III. Prueba de *t* del *pH* [H+] para las temporadas de muestreo.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Temporada	pH [H+]	{Alta precipitación}	{Baja precipitación}	40	40	1.6E-08

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
1.2E-08	-5.0E-10	8.8E0-09	0.00	0.00	0.0001

T	gl	p	prueba
1.79	60	0.0791	Bilateral

IV. Prueba de *t* de la *temperatura (°C)* para las temporadas de muetreo en la Granja Avícola de Moca.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Temporada	Temperatura	{Alta precipitación}	{Baja precipitación}	20	20	31.70

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
29.05	1.61	3.69	2.12	3.21	0.3724

T	gl	p	prueba
5.14	38	<0.0001	Bilateral

V. Prueba de *t* de la *temperatura (°C)* para las temporadas de muetreo en la Granja Avícola de Lajas.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Temporada	Temperatura	{Alta precipitación}	{Baja precipitación}	20	20	33.45

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
30.60	1.58	4.12	1.52	6.15	0.0038

T	gl	p	prueba
4.60	28	0.0001	Bilateral

VI. Prueba de *t* de la *temperatura (°C)* para las temporadas de muestreo.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Temporada	Temperatura	{Alta precipitación}	{Baja precipitación}	40	40	32.58

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
29.83	1.87	3.63	2.56	5.17	0.0305

T	gl	p	prueba
6.25	71	<0.0001	Bilateral

VII. Prueba de *t* de la *humedad* para las temporadas de muetreo en la Granja Avícola de Moca.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Temporada	Humedad	{Alta precipitación}	{Baja precipitación}	20	20	73.40

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
62.40	7.23	14.77	22.36	46.99	0.1141

T	gl	p	prueba
5.91	38	<0.0001	Bilateral

VIII. Prueba de *t* de la *humedad* para las temporadas de muestreo en la Granja Avícola de Lajas.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Temporada	Humedad	{Alta precipitación}	{Baja precipitación}	20	20	63.80

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
55.80	6.10	9.90	8.69	9.01	0.9388

T	gl	p	prueba
8.50	38	<0.0001	Bilateral

IX. Prueba de *t* de la *humedad* para las temporadas de muestreo.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Temporada	Humedad	{Alta precipitación}	{Baja precipitación}	40	40	68.60

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
59.10	6.73	12.27	38.76	38.45	0.9803

T	gl	p	prueba
6.84	78	<0.0001	Bilateral

X. Prueba de *t* del *pH* [H+] para las áreas de muestreo en la temporada de baja precipitación.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Áreas de muestreo	pH [H+]	Moca	Lajas	20	20	1.5E-08

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
1.2E-08	4.9E-09	-1.2E-08	0.00	0.00	0.0014

T	gl	p	prueba
-0.85	27	0.4027	Bilateral

XI. Prueba de *t* del *pH* [H+] paras las áreas de muestreo en la temporada de alta precipitación.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Áreas de muestreo	pH [H+]	Moca	Lajas	20	20	1.6E-08

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
1.6E-08	4.1E-09	-5.3E-09	0.00	0.00	0.7607

T	gl	p	prueba
-0.26	38	0.7969	Bilateral

XII. Prueba de *t* del *pH* [H+] para las áreas de muestreo.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Áreas de muestreo	pH [H+]	Moca	Lajas	40	40	1.6E-08

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
1.4E-08	2.4E-09	-6.9E-09	0.00	0.00	0.0019

T	gl	p	prueba
-0.98	65	0.3328	Bilateral

XIII. Prueba de *t* de la *temperatura (°C)* para las áreas de muetreo en la temporada de alta precipitación.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Áreas de muestreo	Temperatura	Moca	Lajas	20	20	31.70

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
33.45	-2.61	-0.89	2.12	1.52	0.4811

T	gl	p	prueba
-4.10	38	0.0002	Bilateral

XIV. Prueba de *t* de la *temperatura (°C)* para las áreas de muetreo en la temporada de baja precipitación.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Áreas de muestreo	Temperatura	Moca	Lajas	20	20	29.05

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
30.60	-2.93	-0.17	3.21	6.15	0.1654

T	gl	p	prueba
-2.27	38	0.0292	Bilateral

XV. Prueba de *t* de la *temperatura (°C)* para las áreas de muestreo.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Áreas de muestreo	Temperatura	Moca	Lajas	40	40	30.38

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
32.03	-2.66	-0.64	4.39	5.82	0.3841

T	gl	p	prueba
-3.27	78	0.0016	Bilateral

XVI. Prueba de *t* de la *humedad* para las áreas de muetreo en la temporada de alta precipitación.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Áreas de muestreo	Humedad	Moca	Lajas	20	20	73.55

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
63.80	6.67	12.83	36.47	8.69	0.0030

T	gl	p	prueba
6.49	28	<0.0001	Bilateral

XVII. Prueba de *t* de la *humedad* para las áreas de muetreo en la temporada de baja precipitación.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Áreas de muestreo	Humedad	Moca	Lajas	20	20	62.40

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
55.80	3.16	10.04	46.99	9.01	0.0007

T	gl	p	prueba
3.94	26	0.0005	Bilateral

XVIII. Prueba de *t* de la *humedad* para las áreas de muestreo.

Prueba T para muestras Independientes

Clasificación	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
Áreas de muestreo	Humedad	Moca	Lajas	40	40	67.98

media(2)	LI(95%)	LS(95%)	Varianza(1)	Varianza(2)	p(Var.Hom.)
59.80	5.05	11.30	72.54	25.04	0.0012

T	gl	p	prueba
5.23	64	<0.0001	Bilateral