

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS I.A.S.A.  
“GRAL. CARLOMAGNO ANDRADE PAREDES”**

**EFEECTO PROBIÓTICO DE *Lactobacillus acidophilus* y  
*Bacillus subtilis* EN CUYES (*Cavia porcellus*) DE ENGORDE.**

**PREVIA A LA OBTENCIÓN DE TÍTULO DE:**

**INGENIERA AGROPECUARIA**

**ELABORADO POR: MÓNICA PATRICIA MOLINA PULLOQUINGA**

**Sangolquí, Junio del 2008**

## EXTRACTO

Con la finalidad de evaluar el efecto probiótico de *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* sobre cuyes de engorde, se realizó esta investigación que constó de tres tratamientos. En el primer tratamiento se utilizaron 48 cuyes sexados y destetados a los 14 días de edad a los que se les suministró 50 mg con una concentración de  $1 \cdot 10^{10}$  de bacterias totales de *Lactobacillus acidophilus* por kg de concentrado. En el segundo tratamiento se empleó 48 cuyes sexados y destetados a los 14 días de edad a los que se les suministro 50 mg con una concentración de  $1 \cdot 10^{10}$  de bacterias totales de *Bacillus subtilis* por kg de concentrado. El tercer tratamiento tuvo el mismo número de animales y con las mismas características, pero a estos no les suministró probiótico.

A los animales bajo tratamiento con probióticos se les administró diariamente las cepas bacterianas combinadas con el balanceado preparado con melaza, sin alterar la ración diaria y la cantidad de forraje que requieren al día.

Se empleó un diseño completamente al azar, las variables en estudio fueron: consumo de materia seca, mortalidad, ganancia de peso, conversión alimenticia y rendimiento a la canal.

Los resultados obtenidos a los 77 días para el consumo de materia seca fueron similares para los tres tratamiento, sin embargo la administración de *B. subtilis* presentó el menor consumo. La ganancia de peso fue análoga para los tres tratamientos, pero el tratamiento con la adición de *L. acidophilus* mostró mayor ganancia de peso a partir de la quinta semana. La conversión alimenticia más deficiente fue para el testigo. El rendimiento a la canal fue mayor para el tratamiento con *L. acidophilus*, pese a que ninguna de las variables evaluadas en los diferentes tratamientos se diferenciaron estadísticamente.

## ABSTRACT

This research was carried out with the finality of evaluate a the probiotic effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus subtilis* on guinea pigs' slaughter, by using three treatments 48 animals 14 days old were weaned and clasificated by sex at and supplied with 50 mg of *Lactobacillus acidophilus* bacteria with  $1 \cdot 10^{10}$  per kilogram of concentrated feed. For the second treatment 48 animals 14 days old were weaned and classiflicated by sex and supplied with 50 mg of *Bacillus subtilis* with a  $1 \cdot 10^{10}$  per kilogram of concentrate feed. The third treatment had the same animal number and characteristics, without probiotic.

The probiotics based on bacteria were given daily to the animals mixed with in feed and molasses keeping the daily ration. This amount was supplied with the daily forage

A Completely Randomized Design was used. The variables were: dry matter intake, mortality, weight gain, feed conversion and slaughter yield.

After 77 days, the three treatments were similar for dry matter intake; however those which received *B. subtilis* showed the lowest intake. The weight gain for the three treatments was similar, but the addition of *L. acidophilus* showed higher weight gain after the fifth week the controls showed the more feed efficient conversion the *L. acidophilus* treatment although none of the evaluated variables, showed the higher slaughter yield

## **CERTIFICACIÓN**

Certificado que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. MÓNICA PATRICIA MOLINA PULLOQUINGA como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA AGROPECUARIA.

Fecha: 30 Junio del 2008.

---

Ing. Zoot. Patricia Falconí Salas  
DIRECTORA

---

Ing. M. Sc. César Falconí  
CODIRECTOR

---

Ing. M.Sc Gabriel Suárez  
BIOMETRISTA

## **DEDICATORIA**

Esta investigación se la dedicó a Dios y a la Virgen María por ser quienes me han permitido llegar a culminar mi carrera con vida y salud.

A mis amados padres Blanca y Ángel que se han esforzado todo el tiempo por ayudarme a conseguir mis metas y me han brindado todo su amor y apoyo.

A mis hermanas Valeria y Doris por ser un gran apoyo en mi vida.

A la memoria de mi abuelita Gloria que siempre deseo verme como profesional y aunque ahora esta junto a Dios se que estará muy feliz.

A mis amigos con quienes he compartido momentos agradables y que siempre estuvieron apoyándome.

A todas aquellas personas que buscan nuevas alternativas para el manejo de una especie animal.

**Mónica.**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios y a la Virgen María que han sido mi piedra angular durante toda mi vida.

A mis queridos padres por ser mi apoyo constante, por el sacrificio que hacen día tras día y por ser la luz de camino.

A mis hermanas Valeria y Doris que son un pedacito de cielo que siempre están junto a mí.

A la Directora de tesis Ing. Zoot. Patricia Falconí y Codirector Ing. M.Sc MBA. César Falconí; por la confianza que tuvieron en mi persona a lo largo del desarrollo de la investigación, por brindarme todo su apoyo y conocimientos para culminar con éxito la investigación.

Al Ing. Agr. M. Sc. Gabriel Suárez; por su valiosa ayuda y contribuciones para el desarrollo de la investigación.

A mis tíos Sandra y Francisco por su apoyo incondicional.

A mis amigos que en transcurso del tiempo en la universidad estuvieron siempre apoyándome.

**Mónica.**

**HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

**MÓNICA PATRICIA MOLINA PULLOQUINGA**

**DIRECTORA DE LA CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS I.A.S.A.**

---

**Ing. Patricia Falconí Salas**

**DELEGADO DE LA UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO**

---

**Secretario Abogado Carlos Orozco**

**Sangolquí, Junio del 2008.**

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS I.A.S.A.**

**EFEECTO PROBIÓTICO DE *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* EN  
CUYES (*Cavia porcellus*) DE ENGORDE.**

**MÓNICA PATRICIA MOLINA PULLOQUINGA**

**2008**

**VIII**



**EFFECTO PROBIÓTICO DE *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* EN  
CUYES (*Cavia porcellus*) DE ENGORDE.**

**MÓNICA PATRICIA MOLINA PULLOQUINGA**

**REVISADO Y APROBADO POR:**

**Ing. Patricia Falconí Salas**

**DIRECTORA DE LA CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS I.A.S.A.**

**Ing. Zoot. Patricia Falconí**

**DIRECTORA DE LA  
INVESTIGACIÓN**

**Ing. M.Sc MBA. César Falconí**

**CODIRECTOR DE LA  
INVESTIGACIÓN**

**Ing. Agr. M. Sc. Gabriel Suárez**

**BIOMETRISTA**

**Secretario Abogado Carlos Orozco**

**DELEGADO DE LA UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO**

**Sangolquí, Junio del 2008.**

**EFFECTO PROBIÓTICO DE *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* EN  
CUYES (*Cavia porcellus*) DE ENGORDE.**

**MÓNICA PATRICIA MOLINA PULLOQUINGA**

Aprobado por los señores miembros del tribunal de calificación del informe técnico.

**CALIFICACIÓN      FECHA**

**DIRECTORA**

**Ing. Zoot. Patricia Falconí**

\_\_\_\_\_

**CODIRECTOR**

**Ing. M.Sc MBA. César Falconí**

\_\_\_\_\_

Certifico que las calificaciones fueron presentadas en esta Secretaría.

**Secretario Abogado Carlos Orozco**

**DELEGADO DE LA UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO**

# ***DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA***

## ***CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS***

### ***CERTIFICADO***

Ing. Zoot. Patricia Falconí e Ing. M.Sc MBA. César Falconí

#### **CERTIFICAN**

Que el trabajo titulado “EFECTO PROBIÓTICO DE *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* EN CUYES (*Cavia porcellus*) DE ENGORDE”, realizado por Mónica Patricia Molina Pulloquinga, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a que la investigación presenta una nueva alternativa no contaminante para el manejo de cuyes en la etapa de engorde; permitiendo abastecer la demanda interna de carne de cuy; se recomienda su publicación.

El mencionado trabajo consta de dos documentos empastados y cinco discos compactos el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf).

Autorizan a Mónica Patricia Molina Pulloquinga que lo entregue a Ing. Zoot Patricia Falconí, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, 30 de Junio de 2008

---

Ing. Zoot. Patricia Falconí  
DIRECTOR

---

Ing. M.Sc MBA. César Falconí  
CODIRECTOR

# ***DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA***

*CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS*

## ***AUTORIZACIÓN***

Yo, Mónica Patricia Molina Pulloquina

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución el trabajo “EFECTO PROBIÓTICO DE *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* EN CUYES (*Cavia porcellus*) DE ENGORDE”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 30 de Junio del 2008.

---

**Mónica Patricia Molina Pulloquina**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**DECLARACION DE RESPONSABILIDAD**

Mónica Patricia Molina Pulloquina

**DECLARO QUE:**

El proyecto de grado denominado “EFECTO PROBIÓTICO DE *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* EN CUYES (*Cavia porcellus*) DE ENGORDE”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 07 de Junio del 2008.

**Mónica Patricia Molina Pulloquina**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>5</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>5</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>6</b>
<b>PRODUCCIÓN DE CUYES</b> .....	<b>6</b>
<i>Generalidades</i> .....	6
<i>Descripción zoológica</i> .....	6
<i>Características morfológicas</i> .....	7
<i>Anatomía y fisiología digestiva del cuy</i> .....	8
Necesidades nutritivas del cuy.....	12
Proteína.....	13
Fibra.....	14
Energía .....	14
Grasa .....	15
Minerales .....	16
Vitamina C.....	16
Agua.....	16
Sistemas de alimentación en cuyes .....	18
Alimentación con forraje .....	19
Alimentación mixta.....	19
Alimentación a base de concentrado .....	20
<i>Sanidad en cuyes</i> .....	20
Enfermedades que afectan al tracto digestivo .....	20
Salmonelosis.....	21
Colibacilosis .....	21
<i>Enfermedades parasitarias</i> .....	21
Protozoos.....	22
Tremátodos.....	23
Nemátodos.....	23
<b>BACTERIAS PRESENTES EN LOS LÁCTEOS</b> .....	<b>24</b>
<i>LECHE DE VACA CRUDA</i> .....	24
Microorganismos de importancia en la leche cruda .....	24
Bacterias .....	25
<b>PRODUCTOS LÁCTEOS CON FERMENTACIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>YOGURT</b> .....	<b>27</b>
<b>SUERO DE LECHE DERIVADO DE LA ELABORACIÓN DE QUESOS</b> .....	<b>28</b>
<b>BACTERIAS CON CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS</b> .....	<b>29</b>
<b>BACTERIAS PRODUCTORAS DE ACIDO LÁCTICO (BAL)</b> .....	<b>30</b>
<i>Clasificación de las bacterias lácticas</i> .....	31
<i>Mecanismo de acción de las BAL</i> .....	32
<b>LACTOBACILLUS</b> .....	<b>34</b>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	35

<b>BACTERIAS FORMADORAS DE ESPORAS .....</b>	<b>36</b>
<i>Bacillus subtilis</i> .....	37
<b>PROBIÓTICOS EN LA NUTRICIÓN ANIMAL.....</b>	<b>38</b>
Generalidades.....	38
Definiciones de probióticos por varios autores.....	39
Criterios para considerar a un microorganismo como probiótico .....	41
Propiedades de los probióticos en animales .....	42
Probióticos en la salud gastrointestinal .....	44
<b>MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE CULTIVOS MICROBIANOS.....</b>	<b>45</b>
Conservación en refrigeración .....	46
Conservación por congelación.....	47
Conservación en Nitrógeno líquido (-196°C).....	48
Conservación por deshidratación .....	48
Liofilización.....	49
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
<b>MATERIALES EMPLEADOS EN LA FASE DE LABORATORIO .....</b>	<b>53</b>
<b>MATERIALES EMPLEADOS EN LA FASE DE CAMPO .....</b>	<b>55</b>
<b>MÉTODOS UTILIZADOS EN LA FASE DE LABORATORIO .....</b>	<b>55</b>
Localización geográfica .....	55
Muestreo para la obtención de bacterias .....	56
Aislamiento y purificación de <i>Bacillus subtilis</i> .....	56
Caracterización de <i>Bacillus subtilis</i> .....	57
Prueba de tratamiento térmico .....	58
Morfología .....	58
Tinción Gram .....	58
Tinción de esporas.....	59
Forma .....	59
Prueba de KOH al 3% .....	60
Oxidasa .....	60
Catalasa .....	60
Hidrólisis de almidón .....	60
Producción de ácido.....	61
Producción de gas.....	61
Producción de acetoína.....	62
Manitol .....	63
Arabinosa.....	63
Glucosa.....	64
Tinción Ziel – Neelsen.....	64
TSI (Triple Sugar Iron) .....	65
Aislamiento y purificación de <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	66
Caracterización de <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	67
API 50 CHL.....	68
Liofilización de las bacterias.....	68
Pruebas de calidad del probiótico .....	69
Pruebas de sobrevivencia de las bacterias a la melaza.....	70
Pruebas de sobrevivencia de las bacterias al aparato digestivo del cuy.....	70
<b>MÉTODOS EMPLEADOS EN LA FASE DE CAMPO .....</b>	<b>70</b>
Localización geográfica .....	70
Factores en estudio.....	71
Tratamientos.....	71
Descripción de los tratamientos .....	71

Diseño experimental .....	72
Tipo de diseño.....	72
Distribución de parcelas en el área experimental .....	73
Esquema del Análisis de Varianza (ADEVA).....	73
Análisis Funcional .....	73
<b>ANIMALES Y ALOJAMIENTO .....</b>	<b>73</b>
<i>Suministró de la alimentación de cuyes tratados con probióticos</i> .....	74
<i>Cálculos para suministrar el probiótico mas balanceado</i> .....	75
<b>VARIABLES A EVALUARSE .....</b>	<b>76</b>
<i>Consumo de materia seca</i> .....	76
<i>Mortalidad</i> .....	77
<i>Ganancia de peso</i> .....	77
<i>Conversión alimenticia</i> .....	77
<i>Rendimiento a la canal</i> .....	77
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>78</b>
<b>FASE DE LABORATORIO .....</b>	<b>78</b>
<i>Aislamiento y purificación de colonias bacterianas</i> .....	78
<i>Caracterización de los aislamientos bacterianos</i> .....	79
<i>Control de calidad de aislamientos de los liofilizados</i> .....	81
<i>Sobrevivencia de las bacterias en el aparato digestivo del cuy</i> .....	85
<b>RESULTADOS DE LA FASE DE CAMPO.....</b>	<b>87</b>
<i>Consumo de materia seca</i> .....	87
<i>Ganancia de peso</i> .....	91
<i>Conversión alimenticia</i> .....	96
<i>Rendimiento a la canal</i> .....	99
<i>Mortalidad</i> .....	101
<i>Análisis económico</i> .....	102
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>104</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>106</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>117</b>



## INDICE DE CUADROS

CUADRO 2.1.2.1. CLASIFICACIÓN ZOOTÉCNICA. ....	6
CUADRO 2.4.1.2. REQUERIMIENTOS NUTRITIVOS DEL CUY. ....	12
CUADRO 2.5.4.1 RESUMEN DE LOS EFECTOS BENÉFICOS DE LACTOBACILLUS EN PRODUCCIÓN ANIMAL. ....	44
CUADRO 4.1.1.1.1 PRODUCTOS DE PROCEDENCIA Y CODIFICACIÓN DE LOS AISLADOS BACTERIANOS. IASA, ECUADOR, 2008. ....	78
CUADRO 4.1.3.1. POBLACIÓN VIABLE DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> EN PRUEBAS DE CALIDAD DE LOS LIOFILIZADOS. IASA, ECUADOR, 2008. ....	81
CUADRO 4.1.3.2. POBLACIÓN VIABLE DE <i>B. SUBTILIS</i> EN PRUEBAS DE CALIDAD DE LOS LIOFILIZADOS. IASA, ECUADOR, 2008. ....	82
CUADRO 4.1.4.1. NÚMERO DE COLONIAS DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> AL MEZCLAR EL PROBIÓTICO CON MELAZA. IASA, ECUADOR, 2008. ....	84
CUADRO 4.1.4.2. NÚMERO DE COLONIAS DE <i>B. SUBTILIS</i> AL MEZCLAR EL PROBIÓTICO CON MELAZA. IASA, ECUADOR, 2008. ....	84
CUADRO 4.2.1.1. ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA EL CONSUMO DE MATERIA SECA EN CUYES DE ENGORDE BAJO EL SUMINISTRO DE PROBIÓTICOS A BASE DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> Y <i>B. SUBTILIS</i> PARA LA FASE DE ENGORDE. IASA, ECUADOR, 2008. ....	88
CUADRO 4.2.1.2. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE PROBIÓTICOS A BASE DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> Y <i>B. SUBTILIS</i> SOBRE EL CONSUMO DE MATERIA SECA EN CUYES DE ENGORDE. ....	89
CUADRO 4.2.2.1. ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA LA GANANCIA DE PESO EN CUYES DE ENGORDE BAJO LA SUMINISTRACIÓN DE PROBIÓTICOS A BASE DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> Y <i>B. SUBTILIS</i> DURANTE 11 SEMANAS. IASA, ECUADOR, 2008. ....	92
CUADRO 4.2.2.2 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE PROBIÓTICOS A BASE DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> Y <i>B. SUBTILIS</i> SOBRE LA GANANCIA DE PESO EN CUYES DE ENGORDE DURANTE 11 SEMANAS. ....	93
CUADRO 4.2.3.1. ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA LA CONVERSIÓN ALIMENTICIA EN CUYES DE ENGORDE BAJO EL SUMINISTRO DE PROBIÓTICOS A BASE DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> Y <i>B. SUBTILIS</i> EN PRUEBAS EN CAMPO DURANTE 11 SEMANAS. IASA, ECUADOR, 2008. ....	96

CUADRO 4.2.3.2: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE PROBIÓTICOS A BASE DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> Y <i>B. SUBTILIS</i> SOBRE LA CONVERSIÓN ALIMENTICIA EN CUYES DE ENGORDE DURANTE 11 SEMANAS.....	97
CUADRO 4.2.4.1. ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA EL RENDIMIENTO A LA CANAL EN CUYES DE ENGORDE BAJO LA SUMINISTRACIÓN DE PROBIÓTICOS A BASE DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> Y <i>B.SUBTILIS</i> DURANTE 11 SEMANAS. IASA, ECUADOR. ....	100
CUADRO 4.2.4.2. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE PROBIÓTICOS A BASE DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> Y <i>B. SUBTILIS</i> SOBRE EL RENDIMIENTO A LA CANAL EN CUYES DE ENGORDE DURANTE 11 SEMANAS. ...	100
CUADRO 4.3.1. COSTOS VARIABLES Y BENEFICIOS PARA LOS TRATAMIENTOS CON LA ADICIÓN DE PROBIÓTICOS A BASE DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> Y <i>B.SUBTILIS</i> EN LA RACIÓN ALIMENTICIA EN CUYES DE ENGORDE. ....	102
CUADRO 4.3.2. COSTOS VARIABLES Y BENEFICIO NETO PARA LOS TRATAMIENTOS CON LA ADICIÓN DE PROBIÓTICOS A BASE DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> Y <i>BACILLUS SUBTILIS</i> EN LA RACIÓN ALIMENTICIA EN CUYES DE ENGORDE. ....	103

## ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

FIGURA 4.2.1.1. COLONIAS DE <i>B. SUBTILIS</i> (A) TINCIÓN GRAM DE <i>B. SUBTILIS</i> (B) COLONIAS DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> (C) TINCIÓN GRAM <i>L. ACIDOPHILUS</i> DE (D). IASA, ECUADOR, 2008. ....	80
FIGURA 4.1.3.1.2 DILUCIONES DE LIOFILIZADO A BASE DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> (A) COLONIAS DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> EN MRS (B). IASA, ECUADOR, 2008. ....	81
FIGURA 4.1.3.2.1. LIOFILIZADO DE <i>B. SUBTILIS</i> (A) COLONIAS DE <i>B. SUBTILIS</i> EN PCA.....	82
FIGURA 4.1.4.3. COLONIAS DE <i>B. SUBTILIS</i> (A) COLONIAS DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> (B) DILUCIONES BACTERIANAS CON MELAZA (C). IASA, ECUADOR, 2008.....	84
GRÁFICO 1: CONSUMO DE ALIMENTO DE MATERIA SECA DE CUYES BAJO LA ADMINISTRACIÓN DE PROBIÓTICOS A BASE DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> Y <i>B. SUBTILIS</i> EN LA RACIÓN ALIMENTICIA, DURANTE 11 SEMANAS. IASA, ECUADOR, 2008. ....	89
GRÁFICO 2: GANANCIA DE PESO DE LOS CUYES BAJO LA ADMINISTRACIÓN DE PROBIÓTICOS A BASE DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> Y <i>B. SUBTILIS</i> EN LA RACIÓN ALIMENTICIA DURANTE 11 SEMANAS.....	93
GRÁFICO 3: CONVERSIÓN ALIMENTICIA DE CUYES BAJO LA ADMINISTRACIÓN DE PROBIÓTICOS A BASE DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> Y <i>B. SUBTILIS</i> EN LA RACIÓN ALIMENTICIA DURANTE 11 SEMANAS.....	98
GRAFICO 4: RENDIMIENTO A LA CANAL DE CUYES BAJO LA ADMINISTRACIÓN DE PROBIÓTICOS A BASE DE <i>L. ACIDOPHILUS</i> Y <i>B.SUBTILIS</i> EN LA RACIÓN ALIMENTICIA DURANTE 11 SEMANAS.....	101

## **LISTA DE ANEXOS**

<b>ANEXO 1. RESULTADOS DE LA PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN IASA Y CIMICC.....</b>	<b>116</b>
<b>ANEXO 2. FOTOS DE LA FASE DE LABORATORIO.....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO 3. FOTOS DE LA FASE CAMPO .....</b>	<b>118</b>

## **ABREVIATURAS**

ADEVA	Análisis de varianza.
BAL	Bacterias ácido lácticas.
°C	Centígrados.
ED	Energía digestible.
g	Gramo.
kg	Kilogramo.
kcal	Kilocaloría
l	Litro.
MS	Materia seca
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar.
mg	Miligramo.
ml	Mililitro.
Pa	Pascales
ppm	Partes por millón

RPM	Revoluciones por minuto.
TGI	Tracto Gastrointestinal
ufc	Unidades formadoras de colonia
μ	Micras

## I. INTRODUCCIÓN

Entre los países andinos Ecuador y Perú están a la cabeza de la producción de cuyes, debido a que esta especie es altamente utilizada en la alimentación del hombre andino.

Actualmente nuestro país tiene una población de 5067049 cuyes; distribuidos en las diferentes regiones, en la Sierra se encuentra el mayor porcentaje de la población con 4804614 animales, seguido de la región Amazónica donde existen 190466 animales, mientras que en la Costa se encuentra la menor población con 71969 animales (III Censo Nacional Agropecuario-datos Nacionales ECUADOR INEC-MAG-SICA 2002).

Esta especie no requiere de cuidados especiales, se adapta a diversas condiciones climáticas y la carne es una de las más ricas y nutritivas por su alto contenido proteico y bajo nivel lipídico (principalmente de colesterol). Las características de la carne generaron una gran demanda, por lo que en el país especialmente en la región Sierra se establecieron varias explotaciones de cuyes, pero solo algunas de las explotaciones son manejadas técnicamente.

Los objetivos de toda explotación pecuaria es obtener una tasa de natalidad elevada, excelente ganancia de peso y mayor rapidez en el crecimiento, pero como la mayoría de las explotaciones caviolas son manejadas tradicionalmente no llegan a cumplir con los objetivos y en busca de mejorar la producción recurren a emplear antibióticos con fines profilácticos y terapéuticos.

Los antibióticos sirven como fármacos y también como promotores de crecimiento, debido a que estos ayudan en el control de la flora bacteriana patógena, generando un mayor aprovechamiento de los nutrientes del pienso, por lo cual existe una mayor ganancia de peso, pero el uso inadecuado y la sobredosis empleada en la administración de este producto dio lugar a la formación de bacterias resistentes a los antibióticos comunes.

Gustafson (1991), menciona el riesgo para la salud pública, argumentando que el uso de antibióticos en la alimentación animal como terapéuticos o profilácticos, aplicados en pequeñas dosis y por largos periodos de tiempo, podrían inducir a una pérdida significativa de la eficacia tanto en el hombre (consumidor) como en el animal, así como a graves desequilibrios en la población microbiana intestinal que se traducirá en cuadros diarreicos inespecíficos al disminuir o desaparecer la flora bacteriana protectora (Gotz 1979).

Por este motivo, la suplementación con antibióticos como promotores de crecimiento a partir de 1969, se ha limitado a aquellos no implicados en el tratamiento de enfermedades (Parker 1974).

La flora intestinal en los mamíferos no rumiantes consta de unos  $10^{11}$ - $10^{14}$  microorganismos vivos (Tannock *et al.*1990). La microflora intestinal, entre otras funciones, ejerce un efecto protector en el hospedero contra la colonización del tracto intestinal por microorganismos extraños. El balance y la composición de la microflora normal pueden ser afectados por enfermedades, uso de antibióticos, situaciones de “stress”, alimentación y otros (Holdeman 1976).

Frente a este gran problema, fue necesario buscar nuevas alternativas y dentro de ellas los probióticos adquieren gran interés. Lindgren y Dobrogosz (1990), citan diversos tipos de bacterias que pueden integrar un probiótico, sin embargo, las utilizadas con mayor frecuencia son cepas de bacterias ácido – lácticas (BAL) administradas por vía oral o añadida en el pienso de forma individual o combinada.

Hillman (2001), señala que el término "probiótico" se usa para describir una serie de cultivos vivos de una o varias especies microbianas, que cuando son administrados como aditivos alimenticios a los animales provocan efectos beneficiosos. El efecto se expresa en modificaciones en la población microbiana del tracto digestivo que permite mayor asimilación de nutrientes y/o degradación de alimentos. La mayoría de las bacterias que se utilizan como probióticos en los animales de granja pertenecen a las especies *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bacillus*, aunque también se utilizan levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y hongos *Aspergillus oryzae*.

Los efectos de los probióticos son mucho más notables en las primeras semanas de vida de los animales, especialmente en el período posterior al destete en el caso de los mamíferos, puesto que los animales están expuestos a varios factores estresantes como el cambio de comida y hábitat, los cuales determinan un desequilibrio microbiano en el área intestinal desencadenándose proceso diarreicos ocasionando perdidas económicas (Rodríguez 1994).

Los probióticos son aditivos totalmente seguros para los animales, el consumidor y el medio ambiente, pero tienen un inconveniente con el precio, debido a que este es entre un 20 y un 30 % superior al de los antibióticos promotores de crecimiento.



La presente investigación esta orientada a comprobar el efecto positivo de los probióticos compuestos por *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* sobre el consumo de materia seca, ganancia de peso, conversión alimenticia, mortalidad, y rendimiento a la canal en cuyes de engorde. La información generada en este estudio contribuirá con una nueva alternativa para el manejo de cuyes de engorde.

# OBJETIVOS

## A. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto probiótico de *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* en cuyes de engorde.

## B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* de muestras de leche cruda, yogurt natural y suero de leche.
- Caracterizar las bacterias aisladas mediante pruebas bioquímicas y morfológicas.
- Optimizar el protocolo para la conservación de bacterias mediante la liofilización.
- Evaluar la eficiencia de los tratamientos a través de la ganancia de peso, conversión alimenticia, mortalidad, consumo de materia seca y rendimiento a la canal de los cuyes en tratamiento.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. PRODUCCIÓN DE CUYES

#### 2.1.1. Generalidades

El cuy (cobayo o curí) es un mamífero roedor originario de la zona andina de Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú. Constituye un producto alimenticio de alto valor nutricional que contribuye a la seguridad alimentaria de la población rural de escasos recursos.

La distribución de la población de cuyes en el Perú y el Ecuador es amplia; se encuentra distribuida en casi en todo el territorio, mientras que en Colombia y Bolivia su distribución es regional y con poblaciones menores. Por su capacidad de adaptación a diversas condiciones climáticas, los cuyes pueden encontrarse desde la costa hasta alturas de 4 500 m.s.n.m y en zonas tanto frías como cálidas.

#### 2.1.2. Descripción zoológica

En la escala zoológica (Orr 1966, citado por Moreno 1989), el cuy se clasifica zoológicamente así:

##### Cuadro 2.1.2.1. Clasificación zootécnica.

Orden :	Rodentia
Suborden:	Hystricomorpha
Familia :	Caviidae
Género :	<i>Cavia</i>
Especie :	<i>Cavia aperea aperea</i> Erxleben
	<i>Cavia aperea aperea</i> Lichtenstein
	<i>Cavia cutleri</i> King
	<i>Cavia porcellus</i> Linnaeus
	<i>Cavia cobaya</i>

### 2.1.3. Características morfológicas

La forma de su cuerpo es alargada y cubierto de pelos desde el nacimiento. Los machos desarrollan más que las hembras, por su forma de caminar y ubicación de los testículos no se puede diferenciar el sexo sin coger y observar los genitales. A continuación se describen las partes del cuerpo de cuyes.

**Cabeza.** Relativamente grande en relación a su volumen corporal, de forma cónica y de longitud variable de acuerdo al tipo de animal.

Las **orejas** por lo general son caídas, aunque existen animales que tienen las orejas paradas porque son más pequeñas, casi desnudas pero bastante irrigadas.

Los **ojos** son redondos vivaces de color negro o rojo, con tonalidades de claro a oscuro.

El **hocico** es cónico, con fosas nasales y ollares pequeños, el labio superior es partido, mientras que el inferior es entero, sus incisivos alargados con curvatura hacia dentro, crecen continuamente, no tienen caninos y sus molares son amplios. El maxilar inferior tiene las apófisis que se prolongan hacia atrás hasta la altura del axis.

Presentan la fórmula dentaria siguiente:

$$I (1/1), C (0/0), PM (1/1), M (3/3) = \text{Total } 20$$

**Cuello.** Grueso, musculoso y bien insertado al cuerpo, conformado por siete vértebras de las cuales el atlas y el axis están bien desarrollados.

**Tronco.** De forma cilíndrica y esta conformada por 13 vértebras dorsales que sujetan un par de costillas articulándose con el esternón, las 3 últimas son flotantes.

**Abdomen.** Tiene como base anatómica a 7 vértebras lumbares, el abdomen es de gran volumen y capacidad.

**Extremidades.** En general cortas, siendo los miembros anteriores más cortos que los posteriores. Ambos terminan en dedos, provistos de uñas cortas en los anteriores y grandes y gruesas en las posteriores. El número de dedos varía desde 3 para los miembros posteriores y 4 para los miembros anteriores. Siempre el número de dedos en las manos es igual o mayor que en las patas. Las cañas de los posteriores lo usan para pararse, razón por la cual se presentan callosos y fuertes (Zaldívar 1976, Cooper y Schiller 1975).

#### **2.1.4. Anatomía y fisiología digestiva del cuy**

##### **➤ Aparato digestivo:**

Boca, faringe, esófago, estómago, intestinos delgado y grueso, glándulas salivales, páncreas e hígado.

En el estómago se secreta ácido clorhídrico cuya función es disolver al alimento convirtiéndolo en una solución denominada quimo. El ácido clorhídrico además destruye las bacterias que son ingeridas con el alimento cumpliendo una función protectora del organismo.

En el intestino delgado ocurre la mayor parte de la digestión y absorción, aquí son absorbidas la mayor parte del agua, las vitaminas y otros microelementos.

Los alimentos no digeridos, el agua no absorbida y las secreciones de la parte final del intestino delgado pasan al intestino grueso en el cual no hay digestión enzimática; sin embargo, en esta especie que tiene un ciego desarrollado existe digestión microbiana.

La absorción en el ciego es muy limitada en comparación con el intestino delgado; sin embargo, moderadas cantidades de agua, sodio, vitaminas y algunos productos de la digestión microbiana son absorbidas a este nivel. Finalmente todo el material no digerido ni absorbido llega al recto y es eliminado a través del ano (INIA 1995).

#### ➤ **Fisiología digestiva:**

Estudia los mecanismos que se encargan de transferir nutrientes orgánicos e inorgánicos del medio ambiente al medio interno, para luego ser conducidos por el sistema circulatorio a cada una de las células del organismo. Es un proceso bastante complejo que comprende la ingestión, la digestión y la absorción de nutrientes y el desplazamiento de estos a lo largo del tracto digestivo (Chauca 1993).

- **Ingestión:** alimentos llevados a la boca.

- **Digestión:** los alimentos son fragmentados en moléculas pequeñas para poder ser absorbidas a través de la membrana celular. Se realiza por acción de ácidos y enzimas específicas y en algunos casos, por acción microbiana.
- **Absorción:** las moléculas fragmentadas pasan por la membrana de las células intestinales a la sangre y a la linfa.

El cuy, especie herbívora monogástrica, tiene un estómago donde inicia su digestión enzimática y un ciego funcional donde se realiza la fermentación bacteriana; su mayor o menor actividad depende de la composición de la ración. El cuy realiza cecotrófia para reutilizar el nitrógeno, lo que permite un buen comportamiento productivo con raciones de niveles bajos o medios de proteína.

El cuy está clasificado según su anatomía gastrointestinal como fermentador post-gástrico debido a los microorganismos que posee a nivel del ciego. El movimiento de la ingesta a través del estómago e intestino delgado es rápido, no demora más de dos horas en llegar la mayor parte de la ingesta al ciego (Reid 1948, citado por Gómez y Vergara 1993). Sin embargo, el paso por el ciego es más lento pudiendo permanecer en el parcialmente por 48 horas. Se conoce que la celulosa en la dieta retarda los movimientos del contenido intestinal permitiendo una mayor eficiencia en la absorción de nutrientes, siendo en el ciego e intestino grueso donde se realiza la absorción de los ácidos grasos de cadenas cortas.

La absorción de los otros nutrientes se realiza en el estómago e intestino delgado incluyendo los ácidos grasos de cadenas largas. El ciego de los cuyes es un órgano

grande que constituye cerca del 15% del peso total (Hagan y Robison 1953, citado por Gómez y Vergara, 1993).

La flora bacteriana existente en el ciego permite un buen aprovechamiento de la fibra (Reid 1958, citado por Gómez y Vergara, 1993). La producción de ácidos grasos volátiles, síntesis de proteína microbial y vitaminas del complejo B la realizan microorganismos, en su mayoría bacterias gram-positivas, que pueden contribuir a cubrir sus requerimientos nutricionales por la reutilización del nitrógeno a través de la cecotrófia.

El cuy es un animal que realiza cecotrófia, ya que produce dos tipos de heces, una rica en nitrógeno que es reutilizada (cecótrofo) y otra que es eliminada como heces duras. El cuy toma las heces y las ingiere nuevamente pasando al estómago e inicia un segundo ciclo de digestión que se realiza generalmente durante la noche. Este fenómeno constituye una de las características esenciales de la digestión del cuy.

Esta doble digestión tiene una singular importancia para el aprovechamiento de azufre. Las heces que ingiere el cuy actúan notablemente como suplemento alimenticio (Holstenius y Bjomhag 1985, citado por Caballero 1992).

El ciego de cuyes es menos eficiente que el rumen debido a que los microorganismos se multiplican en un punto que sobrepasa al de la acción de las enzimas proteolíticas. A pesar de que el tiempo de multiplicación de los microorganismos del ciego es mayor que la retención del alimento, esta especie lo resuelve por mecanismos que aumentan su permanencia y en consecuencia la utilización de la digesta (Gómez y Vergara 1993).



### 2.1.4.1. Necesidades nutritivas del cuy

El conocimiento de los requerimientos nutritivos del cuy permitirá elaborar raciones balanceadas que logren satisfacer las necesidades de mantenimiento, crecimiento y producción. Aún no han sido determinados los requerimientos nutritivos del cuy productor de carne en sus diferentes estadios fisiológicos.

Al igual que en otros animales, los nutrientes requeridos por el cuy son: agua, proteína (aminoácidos), fibra, energía, ácidos grasos esenciales, minerales y vitaminas. Los requerimientos dependen de la edad, estado fisiológico, genotipo y medio ambiente donde se desarrolle la crianza.

**Cuadro 2.4.1.1.2. Requerimientos nutritivos del cuy.**

Nutrientes	Unidad	Etapa		
		Gestación	Lactancia	Crecimiento
Proteínas	(%)	18	18-22	13-17
ED <sup>1</sup>	(Kcal/kg)	2 800	3 000	2 800
Fibra	(%)	8-17	8-17	10
Calcio	(%)	1.4	1.4	0.8-1.0
Fósforo	(%)	0.8	0.8	0.4 0.7
Magnesio	(%)	0.1-0.3	0.1 0.3	0.1 0.3
Potasio	(%)	0.5-1.4	0.5-1.4	0.5-1.4
Vitamina C	(mg)	200	200	200

<sup>1</sup> Energía digestible.

*Fuente:* Nutrient requirements of laboratory animals 1990. Universidad de Nariño, Pasto (Colombia) citado por Caycedo 1992.

#### **2.1.4.1.1. Proteína**

Las proteínas constituyen el principal componente de la mayor parte de los tejidos, la formación de cada uno de ellos requiere de su aporte, dependiendo más de la calidad que de la cantidad que se ingiere. Existen aminoácidos esenciales que se deben suministrar a los monogástricos a través de diferentes insumos ya que no pueden ser sintetizados.

El suministro inadecuado de proteína, tiene como consecuencia un menor peso al nacimiento, escaso crecimiento, baja en la producción de leche, baja fertilidad y menor eficiencia de utilización del alimento.

Para cuyes manejados en bioterios, la literatura señala que el requerimiento de proteína es del 20%, siempre que esté compuesta por más de dos fuentes proteicas. Este valor se incrementa a 30 ó 35%, si se suministra proteínas simples tales como caseína o soya, fuentes proteicas que pueden mejorarse con la adición de aminoácidos. Para el caso de la caseína con L-arginina (1% en la dieta) o para el caso de la soya con DL-metionina (0.5% en la dieta) (NRC 1978).

Cuando la alimentación es mixta, la proteína la obtiene por el consumo de la ración balanceada y el forraje; si es una leguminosa la respuesta en crecimiento es superior al logrado con gramíneas. La baja calidad de un forraje obliga al animal a un mayor consumo de concentrado para satisfacer sus requerimientos (Saravia *et al.* 1994).

El requerimiento de proteína es realmente el requerimiento de los distintos aminoácidos que la componen. Algunos aminoácidos son sintetizados, mientras que otros no se sintetizan, entre ellos se encuentra la arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptófano, treonina y valina.

#### **2.1.4.1.2. Fibra**

Este componente tiene importancia en la composición de las raciones no solo por la capacidad que tienen los cuyes de digerirla, sino que su inclusión es necesaria para favorecer la digestibilidad de otros nutrientes, ya que retarda el pasaje del contenido alimenticio a través de tracto digestivo.

El aporte de fibra esta dada básicamente por el consumo de los forrajes que son fuente alimenticia esencial para los cuyes. El suministro de fibra de un alimento balanceado pierde importancia cuando los animales reciben una alimentación mixta. Sin embargo, las raciones balanceadas recomendadas para cuyes deben contener un porcentaje de fibra no menor de 18% (Ninanya 1974).

#### **2.1.4.1.3. Energía**

Los carbohidratos, lípidos y proteínas proveen de energía al animal. Los más disponibles son los carbohidratos, fibrosos y no fibrosos, contenido en los alimentos de origen vegetal. El consumo de exceso de energía no causa mayores problemas, excepto una deposición exagerada de grasa que en algunos casos puede perjudicar el desempeño reproductivo.

El NRC (1978), sugiere un nivel de ED de 3 000 kcal/ kg de dieta. Al evaluar raciones con diferente densidad energética, se encontró mejor respuesta en ganancia de peso y eficiencia alimenticia con las dietas de mayor densidad energética.

Si se enriquece la ración dándole mayor nivel energético se mejoran las ganancias de peso y mayor eficiencia de utilización de alimentos. A mayor nivel energético de la ración, la conversión alimenticia mejora (Zaldívar y Vargas 1969).

#### **2.1.4.1.4. Grasa**

El cuy tiene un requerimiento bien definido de grasa o ácidos grasos no saturados. Su carencia produce un retardo en el crecimiento, además de dermatitis, úlceras en la piel, pobre crecimiento del pelo, así como caída del mismo. Esta sintomatología es susceptible de corregirse agregando grasa que contenga ácidos grasos insaturados o ácido linoleico en una cantidad de 4 g/kg de ración.

El aceite de maíz a un nivel de 3% permite un buen crecimiento sin dermatitis. En casos de deficiencias prolongadas se observaron poco desarrollo de los testículos, bazo, vesícula biliar, así como, agrandamiento de riñones, hígado, suprarrenales y corazón. En casos extremos puede sobrevenir la muerte del animal. Estas deficiencias pueden prevenirse con la inclusión de grasa o ácidos grasos no saturados. Se afirma que un nivel de 3% es suficiente para lograr un buen crecimiento así como para prevenir la dermatitis (Wagner y Manning 1976).

#### **2.1.4.1.5. Minerales**

Los elementos minerales tales como el calcio, potasio, sodio, magnesio, fósforo y cloro son necesarios para el cuy, pero sus requerimientos cuantitativos no han sido determinados. Presumiblemente sean necesarios el hierro, magnesio, cobre, zinc y yodo.

El cobalto es probablemente requerido para la síntesis intestinal de vitamina B<sub>12</sub>, si la dieta no la contiene.

Es de importancia en la actividad de cada elemento la relación Ca:P de la dieta; al respecto se encontró que un desbalance de estos minerales producía una lenta velocidad de crecimiento, rigidez en las articulaciones por la alta incidencia de depósito de sulfato de calcio en los tejidos blandos y alta mortalidad.

#### **2.1.4.1.6. Vitamina C**

La principal fuente de vitamina C son los forrajes verdes, por tanto no es necesario suministrar vitamina C, pero en una dieta sin forraje verde tendría que compensarse con 10 a 30 mg/animal/día, con dietas granuladas que contengan vitamina C, o aportar el ácido ascórbico en la forma de tabletas solubles o polvo cristalino que puede ser añadido al agua de bebida de tal manera de lograr una concentración de 500 mg por litro preparado diariamente.

#### **2.1.4.1.7. Agua**

El agua está indudablemente entre los elementos más importantes que debe considerarse en la alimentación. El animal la obtiene de acuerdo a su necesidad de tres fuentes: una

es el agua de bebida que se le proporciona a discreción al animal, otra es el agua contenida como humedad en los alimentos, y la tercera es el agua metabólica que se produce del metabolismo por oxidación de los nutrientes orgánicos que contienen hidrógeno.

Por costumbre a los cuyes se les ha restringido el suministro de agua de bebida; ofrecerla no ha sido una práctica habitual de crianza. Los cuyes como herbívoros siempre han recibido pastos suculentos en su alimentación con lo que satisfacen su necesidades hídricas. Las condiciones ambientales y otros factores determinan el consumo de agua para compensar las pérdidas que se producen a través de la piel, pulmones y excreciones.

La necesidad de agua de bebida en cuyes depende del tipo de alimentación que reciben. Si se suministra un forraje suculento en cantidades altas (más de 200 g) la necesidad de agua se cubre con la humedad del forraje, razón por la cual no es necesario suministrar agua de bebida. Si se suministra forraje restringido 30 g/animal/día, requiere 85 ml de agua, siendo su requerimiento diario de 105 ml/kg de peso vivo (Zaldívar y Chauca 1975). Los cuyes de recría requiere entre 50 y 100 ml de agua por día pudiendo incrementarse hasta más de 250 ml si no recibe forraje verde y el clima supera temperaturas de 30 °C. Bajo estas condiciones los cuyes que tienen acceso al agua de bebida se ven más vigorosos que aquellos que no tienen acceso al agua. En climas templados, en los meses de verano, el consumo de agua en cuyes de 7 semanas es de 51 ml y a las 13 semanas es de 89 ml. esto con suministro de forraje verde (chala de maíz: 100 g/animal/día).

Cuando reciben forraje restringido los volúmenes de agua que consumen a través del alimento verde en muchos casos está por debajo de sus necesidades hídricas. Los porcentajes de mortalidad se incrementan significativamente cuando los animales no reciben un suministro de agua de bebida. Las hembras preñadas y en lactancia son las primeras afectadas, seguidas por los lactantes y los animales de recría.

La utilización de agua en la etapa reproductiva disminuye la mortalidad de lactantes en 3.22%, mejora los pesos al nacimiento en 17.81 g y al destete en 33.73 g. Se mejora así mismo la eficiencia reproductiva (Chauca *et al.* 1992).

#### **2.1.4.2. Sistemas de alimentación en cuyes**

En cuyes los sistemas de alimentación se adaptan de acuerdo a la disponibilidad de alimento. La combinación de alimentos dada por la restricción del concentrado o forraje, hacen del cuy una especie versátil en su alimentación, pues puede comportarse como herbívoro o forzar su alimentación en función de un mayor uso de balanceados.

Los sistemas de alimentación que es posible utilizar en cuyes son:

- Alimentación con forraje
- Alimentación con forraje + concentrado (mixta)
- Alimentación con concentrado + agua + vitamina C

#### **2.1.4.2.1. Alimentación con forraje**

El cuy es una especie herbívora por excelencia, su alimentación es sobre todo a base de forraje verde y ante el suministro de diferentes tipos de alimento, muestra siempre su preferencia por el forraje.

Una alimentación sobre la base de forraje no se logra el mayor rendimiento de los animales, pues cubre la parte voluminosa y no llega a cubrir los requerimientos nutritivos.

Las leguminosas por su calidad nutritiva se comportan como un excelente alimento, aunque en muchos casos la capacidad de ingesta que tiene el cuy no le permite satisfacer sus requerimientos nutritivos. Las gramíneas tienen menor valor nutritivo por lo que es conveniente combinar especies gramíneas y leguminosas, enriqueciendo de esta manera las primeras.

#### **2.1.4.2.2. Alimentación mixta**

Se denomina alimentación mixta al suministro de forraje más concentrado. La producción cuyícola está basada en la utilización de alimentos voluminosos (forrajes) y la poca utilización de concentrados. Por tanto, el forraje asegura la ingestión adecuada de fibra, vitamina C y ayuda cubrir en parte los requerimientos de algunos nutrientes, mientras el alimento concentrado completa una buena alimentación para satisfacer los requerimientos de proteína, energía, minerales, y vitaminas



### **2.1.4.2.3. Alimentación a base de concentrado**

El utilizar un concentrado como único alimento, requiere preparar una buena ración para satisfacer los requerimientos nutritivos del cuy. Bajo estas condiciones los consumos por animal/día se incrementan, pudiendo estar entre 40 a 60 g/animal/día, esto dependiendo de la calidad de la ración. El porcentaje mínimo de fibra debe ser 9 % y el máximo 18%. Bajo este sistema de alimentación debe proporcionarse diariamente vitamina C.

### **2.1.5. Sanidad en cuyes**

Según (Florián 2004), la mortalidad existente en la crianza de cuyes, como consecuencia del desconocimiento de alternativas en el área de salud animal, es lo que limita el desarrollo de la crianza. En los países andinos la cría de cuyes se realiza de manera tradicional. A causa de problemas sanitarios se tiene la mayor merma de la producción, por lo que es necesario identificar las causas de mortalidad para tomar medidas de prevención y control.

#### **2.1.5.1. Enfermedades que afectan al tracto digestivo**

El cuy como cualquier especie es susceptible a sufrir enfermedades infecciosas, pudiendo ser ellas de diversa naturaleza. El riesgo de enfermedad es alto, pero factible de ser prevenida con adecuada tecnología de explotación. La enfermedad, de cualquier etiología, deprime la producción del criadero, traduciéndose en pérdidas económicas para el productor de cuyes.

➤ **Salmonelosis**

Causada por bacilos gram – negativos (*Salmonella*).

Vía de infección oral.

Los cuyes especialmente los lactantes son susceptibles a salmonelosis, considerada como la enfermedad más grave que afecta a los cuyes. En los lactantes basta únicamente una causa de estrés para desencadenar la enfermedad.

Produce el 95% de mortalidad severa y abortos causando graves pérdidas económicas.

➤ **Colibacilosis**

Causado por *Escherichia coli* y la *Klesbsiela pneumoniae*.

Se presenta especialmente en animales jóvenes.

Produce altas tasas de mortalidad.

**2.1.6. Enfermedades parasitarias.**

Las enfermedades parasitarias al contrario de lo que sucede con las infecciosas, se caracterizan por sus manifestaciones lentas y poco espectaculares, por lo que en la mayoría de las veces pasa desapercibida por los criadores.

Las infestaciones severas repercuten negativamente en la producción; los efectos se traducen en pérdidas económicas que los criadores no cuantifican.

Los factores epidemiológicos que contribuyen a la elevada prevalencia de ecto y endoparásitos en cuyes en las crianzas familiares son las deficientes condiciones higiénicas y sanitarias de los corrales, sobrepoblación animal, crianza promiscua con otras especies domésticas.

Existe una alta susceptibilidad de los cuyes a infecciones parasitarias y ausencia de programas de prevención y control.

El parasitismo puede expresarse clínicamente en forma aguda, cuando animales jóvenes susceptibles ingieren gran cantidad de formas infectivas, que los puede conducir a la muerte. Sin embargo, en la mayor parte de los casos los cuyes son sometidos a una infección gradual a las cuales ellos se adaptan, no presentan síntomas clínicos y están aparentemente sanos. El animal no rinde con eficiencia, reduce su ganancia de peso e incrementa el consumo de alimento como compensación.

Los principales parásitos en los cuyes son:

➤ **Protozoos.**

- La especie económicamente importante es la coccidiosis que es producida por la *Eimeria caviae*.
- Los animales más susceptibles son cuyes jóvenes, principalmente después del destete.
- La sintomatología en los casos agudos se manifiesta por una rápida pérdida de peso, diarrea mucosa con estrías sanguinolentas y muerte generando numerosas pérdidas económicas.

- El tratamiento se hace a base de: Sulfaquinoxalina: 0.9 g/litro de agua, durante una semana.

#### ➤ **Trematodos.**

- La *Fasciola hepática*, llamada vulgarmente «alicuya», se aloja al estado adulto en los conductos biliares. Este parásito es hematófago y sus formas inmaduras durante su migración producen una destrucción masiva del parénquima hepático.
- La infección se produce mediante la alimentación con pastos recolectados en zonas infestadas.
- Produce pérdidas a nivel económico porque afecta animales causando muerte.
- El tratamiento curativo se hace a base de: Triclabendazol (Fascinex): 10 mg/kg de peso.

#### ➤ **Nematodos.**

- La paraspíodera, el trichuris y el passalurus son parásitos específicos de cuyes.
- Las infecciones parasitarias son mixtas, es decir, por varias especies parasitarias, cada una de las cuales ocupa un lugar determinado del tracto intestinal, produciendo trastornos con efectos nutritivos y fisiológicos variados.
- Causa pérdida de peso lo que se traduce en términos económicos, pérdidas para el productor.
- El control debe estar orientado a una limpieza y remoción periódica de la cama, más la utilización de antihelmínticos de amplio espectro como el Levamisol, Femendazol y Albendazol.

- Cuando se ha detectado el problema se aconseja realizar dosificaciones después del destete y repetir el tratamiento al mes, en reproductoras, 15 días antes de la parición, mediante la adición de un antihelmintico al alimento.

## **2.2. BACTERIAS PRESENTES EN LOS LÁCTEOS**

### **2.2.1. LECHE DE VACA CRUDA**

En la leche se encuentran gran variedad de vitaminas, además por poseer azúcares fácilmente fermentables, citratos, grasas y proteínas aportan un medio enriquecido para el crecimiento de microorganismo. Sin embargo es válido notar que se encuentran pocos aminoácidos libres y péptidos de bajo peso molecular, de allí que las bacterias que no posean la capacidad de sintetizar enzimas proteolíticas se verán en mayor dificultad para crecer. Pero en la leche se dan diversa asociaciones de microorganismos que mediante relaciones simbióticas logran desarrollarse en el medio (Alais 1984).

### **2.2.2. Microorganismos de importancia en la leche cruda**

La leche es considerada un medio de cultivo ideal para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos.

A continuación se presenta una breve descripción de los principales microorganismos que pueden encontrarse en leche cruda (Robinson 1987).

### **2.2.2.1. Bacterias**

Dada las características de la leche cruda, los microorganismos predominantes y que se ven favorecidos para su crecimiento son las bacterias. En la leche se pueden encontrar diverso géneros y especies bacterianas. Aquellas de mayor importancia en la industria láctea son las llamadas bacterias lácticas y las enterobacterias.

#### **Bacterias Gram positivas**

##### **a. Bacterias lácticas**

Son un grupo de bacterias de diferentes géneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* *Vagococcus*. Ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se encuentran en el suelo y en cualquier lugar donde existan altas concentraciones de carbohidratos, proteínas desdobladas, vitaminas y poco oxígeno.

Son Gram positivas y su forma puede ser bacilar, cocoide u ovoide. Algunas tienen forma bifida (*Bifidobacterium*). Soportan pH 4.0 en leche.

##### **b. Bacterias esporuladas**

###### ***Bacillus:***

Son bacterias aeróbicas, esporuladas con actividad enzimática variada producen acidificación, coagulación y proteólisis.

### ***Clostridium:***

Son anaerobios estrictos, esporulados y producen gas. Algunos producen toxinas patógenas (*Clostridium botulinum*).

Ambos géneros son de poca importancia en leche cruda, su crecimiento es inhibido por las bacterias lácticas. Cobran importancia en productos lácteos como en leches pasteurizadas, quesos fundidos, leches concentradas, quesos de pasta cocida. Resisten la pasteurización por su capacidad de producir esporas, las cuales solo se destruyen a temperaturas por encima de 100 °C.

## **2.3. PRODUCTOS LÁCTEOS CON FERMENTACIÓN**

Desde los inicios de la civilización se han elaborados estos productos, dado que la fermentación láctica ocurre naturalmente en la leche. Se encontró después que el sabor ácido era producido con más rapidez y uniformidad si se agregaban pequeñas cantidades de producto fermentado a leche fresca y se conservaba la mezcla a temperatura adecuada. Ello fue el origen de los distintos tipos de "cuajos", esto es, sustancias que inician o desencadenan la coagulación de la leche.

Un cuajo o "iniciador" es un cultivo puro o mixto de microorganismo que se agrega a un substrato para iniciar la fermentación deseada. Estas sustancias se emplean ampliamente en la industria de lácteos para producir cambios característicos en la elaboración de mantequilla, leches "cultivadas" y queso.

Estas sustancias contienen dos tipos de bacterias:

- Especies que producen en gran cantidad ácido láctico. Por ejemplo: *S. lactis* y *S. cremoris*.
- Bacterias que producen compuestos sápidos y aromáticos, esto es, *Leuconostoc citrovorum* o *L. dextranicium* (Alais 1970).

Algunas de las asociaciones que se dan en la leche se aprovechan para la elaboración de productos lácteos, como ejemplo se puede citar el yogurt, donde se da una simbiosis entre el *Streptococcus* y el *Lactobacillus* (Alais 1984).

Los productos lácteos elaborados incluyen leche fermentada, queso y mantequilla y son producidos por el tipo láctico de fermentación en que participan bacterias *S. lactis* y el género *Lactobacillus* (Alais 1970).

### **2.3.1. Yogurt**

Las leches fermentadas tienen un valor nutritivo semejante al de la leche original, pero deben tenerse en cuenta algunas modificaciones en su contenido vitamínico, debidas al desarrollo de las especies que pueden consumir o producir vitaminas.

En el caso de yogurt se ha observado la desaparición de la vitamina B<sub>12</sub>, aumentándose el contenido de vitamina B<sub>6</sub> (piridoxina) y permaneciendo sin cambio la riboflavina y los otros factores de este grupo (Alais 1985).



Una ingestión repetida de yogurt provoca una repoblación temporal, muy beneficiosa, en lo que se refiere al buen funcionamiento del tubo digestivo, sobre todo en los casos patológicos y cuando la flora intestinal ha sido alterada o destruida por un tratamiento con antibióticos.

La leche fermentada mas conocida es el yogurt, este puede funcionar como probióticos o simbióticos, ya que contienen tanto bacterias vivas, como productos del metabolismo, que pueden ejercer beneficios en la salud del hospedero.

### **2.3.2. Suero de leche derivado de la elaboración de quesos**

El suero es un subproducto resultante de la elaboración de quesos que se distingue por su elevado valor nutritivo. Sin embargo, grandes cantidades de este subproducto no se aprovechan adecuadamente, y muchas veces se vierten en los ríos aledaños a los centros productores, como parte de los efluentes fabriles. La alta demanda biológica de oxígeno de estos desechos, estimada entre 30 y 50 mil partes por millón (ppm), los convierte en graves focos de contaminación ambiental (Teixeira *et al.* 2003).

El suero es el líquido resultante de la coagulación de la leche durante la elaboración del queso. Se obtiene tras la separación de las proteínas, llamadas caseínas, y de la grasa.

Ese líquido constituye aproximadamente el 90% del volumen de la leche y contiene la mayor parte de sus compuestos que son solubles en agua. La composición química del suero varía dependiendo de las características del lácteo y de las condiciones de elaboración del queso. Su pH oscila entre 5.0 - 6.0 El agua es el componente más abundante en el suero, constituye el 93% o más de este. Le sigue en cantidad el azúcar,

la cual recibe el nombre de lactosa. Este compuesto se encuentra en una proporción cercana al 5%. Un poco menos del 1% del suero lo constituye compuestos nitrogenados, de las cuales la mitad son proteínas, de muy alto valor nutritivo, que se clasifican en albúminas, globulinas y una fracción llamada proteasa-peptona. Otros compuestos del suero son los minerales que se encuentra en concentraciones de alrededor de 0.7%. Se encuentra en mayor cantidad el sodio, el potasio, el magnesio, el cloruro y el fosfato. El suero contiene además las vitaminas hidrosolubles de la leche, de las cuales la más importante es la riboflavina o vitamina B. En cantidades muy variables aparecen grasa y ácido láctico.

El suero es un excelente medio de cultivo, cuya principal fuente de carbono es la lactosa, sin embargo, su uso no se limita a fermentaciones en los que se usen microorganismos capaces de metabolizar este azúcar. La lactosa se puede transformar en glucosa y galactosa, o mediante una primera fermentación, transformarla en ácido láctico, y en una segunda, utilizar el metabolito como fuente de carbono. Entre los productos que se obtienen, o pueden ser obtenidos por fermentación del suero, se encuentran: bacterias lácticas y otros microorganismos usados en las propias queserías; ácido láctico, alcohol, vinagre, ácido propiónico, enzimas como lactosa, proteasas y pectinasas, penicilina, vitamina B<sub>2</sub> y B<sub>12</sub>, aceite y proteína unicelular para alimento humano y de animales (Hayaski 1990).

#### **2.4. BACTERIAS CON CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS**

A principios de siglo se empezó a observar la influencia de determinados microorganismos sobre la digestión humana y animal. Metsnikoff atribuía la larga vida

de los habitantes de los Balcanes a las bacterias del yogurt que consumían. Suponía que el consumo de las bacterias del yogurt alteraba el equilibrio de la microbiota intestinal y suprimía las bacterias de la putrefacción, paralelamente había observado que los campesinos búlgaros, grandes consumidores de leche fermentada, eran muy sanos y longevos. (O' Sullivan *et al.* 1993)

Las bacterias terapéuticas o probióticas se define como aquellos organismos viables que, cuando son consumidos, actúan en el tracto intestinal beneficiando al organismo hospedador. Aunque en general se acepta que las fermentaciones mejoran la digestibilidad, generan aminoácidos libres, producen vitaminas y cofactores en el alimento sustrato (Gilliland 1990).

#### **2.4.1. Bacterias productoras de ácido láctico (BAL)**

Grupo grande de bacterias con la característica común de producir ácido láctico como el principal producto final del metabolismo; se encuentran en la leche y en otros ambientes naturales.

Las bacterias lácticas son gram positivas, ácido tolerantes, algunos en rangos de pH entre 4.8 y 9.6, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían el aumento de la actividad producida por los ácidos orgánicos .

Las bacterias lácticas tienen formas de cocos o de bastoncitos y son catalasa negativa. Sintetizan su ATP en la fermentación láctica de los glúcidos.- El ácido láctico es en algunos casos el único producto final (homofermentación) y en otras ocasiones se produce además etanol, acetato y C O<sub>2</sub> (heterofermentación).

Las bacterias lácticas generalmente aerotolerantes, aunque algunas especie, como las que se encuentran en el intestino de los animales, son anaerobias estrictas. Incluso en presencia de O<sub>2</sub> no son capaces de llevar a cabo las fosforilaciones oxidativas, lo que está muy relacionado con su incapacidad para sintetizar citocromo y enzimas con grupo hemo (Bourgeois *et al.* 1995).

Las bacterias lácticas requieren aminoácidos específicos, vitamina B y otros factores de crecimiento y son incapaces de utilizar hidratos de carbono complejos (Stanley 1998, Hassan y Frank 2001).

#### **2.4.1.1. Clasificación de las bacterias lácticas**

➤ **Homofermentativas:** producen de un 70-90% de ácido láctico. Por ejemplo: *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus*.

➤ **Heterofermentativas:** producen al menos un 50% de ácido láctico más otros compuestos tales como el ácido acético, CO<sub>2</sub> y etanol. Por ejemplo: *L. casei*, *Bifidobacterias*.

- **Mesófilas:** crecen mejor en un rango de temperatura de 25-30°C. Por ejemplo: *L. casei*.
- **Termófilas:** prefieren un rango de 40-44°C. Por ejemplo: *L. delbrueckii*.

➤ **Anaerobias prefieren condiciones facultativas:** Anaerobias para su metabolismo pero son aerotolerantes (la mayoría de las BAL encajan dentro de esta categoría).

➤ **Anaerobias sobreviven sólo en estrictas:** sobreviven sólo en estrictas condiciones anaerobias. Por ejemplo: *Bífidobacterias* (Danone Vitapole).

Las bacterias lácticas homofermentativas producen 1.8 moles de ácido láctico por mol de glucosa fermentada, mientras que las bacterias lácticas heterofermentativas producen aproximadamente un mol de ácido láctico por mol de glucosa y cantidades apreciables de productos secundarios, principalmente gas carbónico, etanol y ácido acético (Eck 1990, Stanley 1998).

#### **2.4.1.2.Mecanismo de acción de las BAL**

Estas bacterias ejercen múltiples efectos beneficiosos en el organismo, es fácil comprender que su mecanismo de acción se establezca por vías muy distintas y a veces poco conocidas. Según Fuller (1989), dichos efectos pueden ser debidos a una acción antagónica frente a grupos de microorganismos específicos, a un efecto sobre su metabolismo o a un estímulo de la inmunidad.

➤ **Disminución del número de microorganismos**

Grossowicks *et al.* (1947), demostraron que las BAL reducían el crecimiento de gérmenes indeseables en el tracto intestinal. Este efecto sería consecuencia de la

producción de compuestos antibacterianos, de la acidez intestinal originada o del antagonismo competitivo.

#### ➤ **Producción de compuestos antibacterianos**

Diversos autores han comprobado la reducción del número de gérmenes patógenos por las BAL mediante la producción de compuestos antibacterianos los cuales han sido denominados de muy diversas formas: Lactobacillin, Lactolin, Lactobrevin, Acidolin y Acidophilin (Shahani *et al.* 1976).

Los BAL pueden también producir sustancias que neutralicen los efectos adversos de un microorganismo al modificar su metabolismo, sin necesidad de destruirlo, pero si disminuyendo su población. Por ejemplo cambios en la actividad enzimática no asociados con cambios en la composición de la flora intestinal.

#### ➤ **Productos finales de la fermentación y la acidez intestinal.**

Los BAL poseen gran capacidad fermentativa, produciendo cantidades significativas de ácidos orgánicos (ácido acético, fórmico y láctico) a partir de carbohidratos simples, lo cual determina una acidez intestinal que limita el crecimiento especialmente de los gérmenes patógenos gram negativos (Ten Brink *et al.* 1987).

Fuller en 1977 demostró que puede detenerse el crecimiento de *E. coli* ajustando el pH de un medio de cultivo a 4.5 mediante la adición de ácido láctico o clorhídrico. Años mas tarde este mismo autor (Fuller *et al.* 1981) administrando yogurt (leche fermentada

por *L. bulgaricus* y *S. termophilus*) a lechones destetados observo como descendía el recuento de *E. coli* en el estómago y duodeno afirmando que el efecto por el yogurt podría ser reproducido por leche acidificada por ácido láctico a un pH de 4.2.

➤ **Antagonismo competitivo.**

La importancia de la microflora indígena en el intestino como factor de resistencia natural frente a los microorganismos potencialmente patógenos, fue reconocida a finales del siglo XIX por Metchnikoff.

Esta microflora indígena es muy estable. La penetración y colonización de microorganismos no indígenas o del medio y/o de otras especies animales es impedida por las BAL, las cuales compiten con otras bacterias en la colonización de zonas intestinales y en la utilización de sustancias nutritivas (Bibel 1988).

La competencia directa de los gérmenes bacterianos por los lugares de adherencia en la superficie epitelial del intestino, es un factor importante en la reducción de los microorganismos al inducir la exclusión de gérmenes patógenos (Scheleifer 1985; Schneitz *et al.* 1993).

#### **2.4.2. LACTOBACILLUS**

Bacterias del género *Lactobacillus* son organismos benéficos de interés particular por su larga historia de uso (Holzapfel 2002).

Los *Lactobacillus* fueron entre los primeros organismos usados por el hombre para la producción de alimentos (Konigs *et al.* 2000) y para la preservación de estos al inhibir la invasión por otros microorganismos que causan enfermedades de origen alimentario o comida descompuesta (Adams 1999). El género *Lactobacillus* es esencial para la alimentación moderna y las tecnologías de alimentos, por el aumentado interés en los efectos benéficos (propiedades funcionales).

Las industrias lácteas y de auto cuidado de la salud están activamente promocionando el uso de *Lactobacillus* en la comida, y estos son usados cada vez más en la alimentación animal por su potencial de reemplazar los promotores antibióticos de crecimiento.

#### **2.4.2.1. *Lactobacillus acidophilus***

La denominación "acidófilo" conduce a errores, pues esta bacteria no tolera más el ácido que otros lactobacilos.

Los bacilos son, miden unas 2 – 6  $\mu$  de largo, y a veces están algo redondeados en los extremos. Se encuentran aislados o en cadenas cortas. La temperatura óptima es de unos 37 °C, la máxima de unos 43 – 48 °C. Por debajo de los 20 °C no se registra crecimiento alguno.

*L. acidophilus* es una bacteria intestinal típica, que se encuentra en las heces fecales del hombre (casi siempre de los niños y muy escasamente en los adultos) y también de algunos mamíferos. A partir de las heces de niños se puede aislar mediante el método de enriquecimiento.



*Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* son usados también para producir lácteos fermentados. Estos organismos generalmente resisten la acidez gástrica y sales biliares. Su tasa de supervivencia en el tracto gastrointestinal se estima entre un 2 y 5% y logran concentraciones suficientes en el colon ( $10^6$ - $10^8$  ufc/ml). Dependiendo de la cepa varía su capacidad de adhesión intestinal, los efectos favorables en cuanto a la digestibilidad de lactosa y su habilidad para prevenir diarrea (Alais 1970).

### **2.4.3. Bacterias formadoras de esporas**

Las bacterias termoresistentes presentes en la leche pasteurizada son de dos tipos:

- Géneros formados de endosporas
- Géneros cuyas formas vegetativas son muy resistentes al calor.

Los primeros son los más importantes y las endosporas que se aíslan en la leche pasteurizada, reflejan el número y tipo de las que se encontraban en la leche cruda. Las especies de *Bacillus* son muy frecuentes y numerosas, pero también se encuentran normalmente endosporas de clostridios.

Las especies de *Bacillus* son los principales componentes de la microflora termoresistentes de la leche pasteurizada (Alais, 1970).

Los bacilos producen enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones.

Los bacilos producen antibióticos y son ejemplos de estos la bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina.

#### **2.4.3.1. *Bacillus subtilis***

*Bacillus subtilis*, realiza una fermentación 2,3 butanediol, cuyos productos principales son butanediol, etanol, CO<sub>2</sub>, y H<sub>2</sub>O. Estos microorganismos también producen glicerol como un producto de la fermentación.

Las características principales de *Bacillus subtilis* son:

- Son bacterias gram positivas
- Son mesófilas
- Producen esporas ovales o cilíndricas
- Son fermentativas, usualmente hidrolizan caseína y almidón
- Los esporangios no son hinchados
- La pared de la spora es delgada
- Catalasa positiva (Bioland).

*Bacillus subtilis* es comúnmente encontrada en el suelo, tiene la habilidad para formar una resistente endospora protectora, lo cual le permite al organismo soportar condiciones ambientales extremas. A diferencia de varias bien conocidas especies, *B. subtilis* ha sido clasificada históricamente como un aerobio obligado, aunque recientes investigaciones han demostrado que esto no es estrictamente correcto.

#### **Clasificación taxonómica:**

Reino: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: *Bacillus*

Especie: *B. subtilis* (Biocrawler 2006).

*B. subtilis*, libera compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas. Estas últimas son polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos.

## **2.5. PROBIÓTICOS EN LA NUTRICIÓN ANIMAL**

### **2.5.1. Generalidades**

El término "probiótico" data de 1965, cuando se usó para referirse a cualquier sustancia u organismo que contribuyera al balance microbiano intestinal, principalmente de los animales de las granjas, luego lo consideraron un suplemento alimenticio microbiano vivo, más que una sustancia, de modo que se hiciera más relevante para los humanos (Fuller 1989).

Los alimentos que contienen un probiótico son denominados como alimentos funcionales (Gibson y Roberfroid 1995).

Un alimento puede ser considerado funcional si se logra demostrar satisfactoriamente que posee un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, que mejora el estado de salud y de bienestar o bien que reduce el riesgo de una enfermedad (Diplock *et al.* 1998).

### **2.5.2. Definiciones de probióticos por varios autores**

La definición establecida por (Diplock *et al.* 1998), es similar a la de (Schaafsma 1996): probiótico es un microorganismo vivo que, al ser ingerido en cantidades suficientes, ejerce un efecto positivo en la salud, más allá de los efectos nutricionales tradicionales.

**Probiótico** palabra de origen griego que significa "a favor de la vida" es el término utilizado para las bacterias amistosas que viven en el tracto gastrointestinal. Afectan benéficamente al hospedero modulando la inmunidad sistémica y de la mucosa. También proporcionan un balance nutricional y microbiano (Naidu *et al.* 1999).

Fuller (1989), Definió a los probióticos como suplementos alimentarios microbianos vivos que tiene efectos beneficiosos para el hospedero mediante la mejora del equilibrio microbiano intestinal.

Saavedra *et al.* (1994), ha propuesto una definición más general, señalando a los probióticos como los microorganismos viables que, ingeridos con la alimentación, pueden tener un efecto positivo en la prevención o en el tratamiento de estados patológicos específicos.

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud o en la fisiología del hospedero (Schrezenmeir y Vrese 2001).

Una vez que los probióticos son ingeridos ocurren cambios en la microflora intestinal que repercuten positivamente en el estado de salud del consumidor.

Es importante resaltar que la flora intestinal es una comunidad interactiva de organismos con funciones específicas para mantener el estado de salud. Esta función es la suma resultante de las diferentes actividades combinadas de los organismos que la conforman como lo son la fermentación de sustratos de la dieta no digeribles y del moco producido por el epitelio con la producción de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) favoreciendo la recuperación y la absorción de calcio, hierro y magnesio, en la regulación del metabolismo de la glucosa reduciendo la glicemia postprandial, así como, la síntesis de la vitamina K y de las del grupo B (Guarner 2000).

Actualmente los microorganismos más utilizados como probióticos, tanto en humanos como en animales son:

*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y levaduras como *Saccharomyces* y *Torulopsis* y hongos del género *Aspergillus* (Dunne *et al.* 2001).

Entre las bacterias probióticas mas utilizadas para el consumo humano se encuentran las llamadas bacterias ácido lácticas (BAL), que incluyen a las siguientes:

*Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei* spp *rhamnosus*, *L. delbrueckii* spp *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis* spp *lactis*, *Lactococcus lactis* spp, *cremoris*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, entre otros (Farnworth 2001).

Los beneficios que ofrecen los probióticos, se pueden categorizar en nutricionales y beneficios terapéuticos. Dentro de lo nutricional se encuentra su papel para aumentar la biodisponibilidad de calcio, zinc, hierro, manganeso, cobre y fósforo. A nivel terapéutico, se pueden utilizar para tratamientos de desórdenes intestinales, hipercolesterolemia, supresión de enzimas pro-carcinogénicas e inmunomodulación, entre otros (Prasad *et al.* 1998).

### **2.5.3. Criterios para considerar a un microorganismo como probiótico**

El microorganismo debe ser capaz de:

- Producirse a gran escala.
- Permanecer viable y estable.
- Debe ser capaz de sobrevivir en el ecosistema intestinal beneficiando al hospedero que lo aloja (Dietanet).

El crecimiento y metabolismo de muchas especies bacterianas de la flora colónica dependen de los sustratos disponibles, la mayoría proveniente de la dieta, por eso se intenta modificarlos usando probióticos.

Los probióticos no colonizan en forma permanente al hospedero, y por eso deben ser ingeridos regularmente. Algunos probióticos son parte de la flora colónica normal y no son considerados patógenos, pero pueden causar infecciones en hospederos especiales.

Las bacterias lácticas constituyen una proporción importante de los cultivos probióticos que se utilizan en la actualidad. Un factor esencial en la elección de un probiótico es su habilidad por sobrevivir en el microambiente intestinal donde ejercerá su acción. Así mismo, hay que señalar que en un mismo género y aún dentro de una misma especie, no todas las cepas son equivalentes en cuanto a sus actividades probióticas (Dietanet).

La adherencia de los probióticos al epitelio intestinal, aunque no es indispensable, es importante para modificar la respuesta inmune del hospedero. Impide que otras bacterias, (*E. coli* enteropatógena y enterotoxigénica, *Salmonella*, *Yersinia*, etc.) se unan al epitelio.

#### **2.5.4. Propiedades de los probióticos en animales**

En la última mitad del siglo 20, se desarrollaron nuevos conceptos para promover la salud animal y asegurar el rendimiento en el crecimiento, eficiencia en la alimentación, y calidad del producto (Zimmermann *et al.* 2001).

Los antibióticos fueron primero añadidos a los alimentos para proteger a los animales contra infecciones, pero los antibióticos también promueven el crecimiento, esta doble función produjo el uso amplio como un aditivo en la alimentación. Sin embargo, debido a preocupaciones de seguridad acerca de la transmisión de la resistencia a los antibióticos, el uso de los antibióticos en alimentación animal ha ido gradualmente declinando desde 1990 y han sido prohibidos completamente desde Enero de 2006. Esta situación llevó a la proposición de alternativas, tales como los microorganismos probióticos (Brambilla y De Filippis 2005).

Los probióticos son microorganismos viables que aumentan la ganancia de peso y los rangos de conversión alimenticia (propiedades zootécnicas) y disminuyen la incidencia de diarrea (Simon *et al.* 2001).

Algunos estudios han reportado que los probióticos manifiestan un aumento en el efecto de crecimiento en situaciones que involucren stress de alguna clase (Yeo y Kim 1997, Thomke y Elwinger 1998), como se encontró en granjas reales más que en ensayos basados en universidades.

Esto asume que los efectos en la salud y los efectos zootécnicos están cercanamente relacionados. La suplementación probiótica ha sido recomendada para el tratamiento o prevención de varias condiciones de stress y enfermedades de un número de especies (Zimmerman 1986).



**Cuadro 2.5.4.1 Resumen de los efectos benéficos de Lactobacillus en producción animal.**

<b>ESPECIES ANIMALES</b>	<b>ESPECIES DE LACTOBACILLUS</b>	<b>COMENTARIOS</b>
<b>Polluelos</b>	<i>L. acidophilus</i>	Aumento de la ganancia de peso corporal, disminución del peso fecal
<b>Broilers</b>	<i>L. acidophilus</i>	Aumenta la ganancia de peso corporal (+6%)
<b>Pollos Broilers</b>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i>	Aumenta el rendimiento de la producción
<b>Pollos Broilers</b>	Probiótico basado en <i>Lactobacillus</i>	Efectos en la inmunidad mediada por células de pollos, como fue mostrado por niveles aparentes mejores de invasión intestinal y desarrollo de oocitos de <i>Fimeria acervulina</i> , en base a mayores niveles de secreción de IL-2 y menores niveles de producción de oocitos de <i>Eimeria acervulina</i>
<b>Gallinas en periodo de postura tardía</b>	<i>L. species</i>	Aumenta la producción de huevos, disminuye la mortalidad, aumenta el factor de conversión pero no la calidad del huevo.
<b>Conejos</b>	<i>Enterococcus faecium</i> y <i>L. jugurt</i>	El producto de soya fermentada causa una reducción del 18.4% en el colesterol total y aumento del 17.8% en la fracción HDL.

Fuente: Bernardeu *et al.* 2005

**2.5.5. Probióticos en la salud gastrointestinal**

Los probióticos pueden influir también en la biodisponibilidad de nutrientes al facilitar un rompimiento de proteínas de la leche entera, liberando calcio y magnesio en grandes cantidades a diferencia de cuando no se utilizan probióticos. Estos parecen estar involucrados también en la síntesis de vitaminas del complejo B, fosfatos y además,

algunas cepas pueden ejercer un efecto estabilizador en la flora intestinal incrementando una resistencia a las infecciones, así como una prevención y tratamiento de diversas formas de diarreas (Gorbach 1996 a)

Cepas de lactobacilos como *Lactobacillus* GG, parecen producir sustancias antimicrobianas que son activas en contra de diversas bacterias presentes en la microflora normal del intestino, como *E. coli*, *Streptococcus*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis* y *Salmonella* (Gorbach 1996 b).

## **2.6. METODOS DE CONSERVACIÓN DE CULTIVOS MICROBIANOS**

El éxito en la preservación de los cultivos microbianos es esencial para las actividades de investigación basadas en la adecuación de estos microorganismos. Las cepas valiosas se tienen que conservar durante largos períodos de tiempo libres de cambios fenotípicos adversos (Tamine y Robinson 1991).

La elección del método de conservación utilizado debe permitir mantener las características del microorganismo por los cuales fue seleccionado (Stanbury *et al.* 1995).

La selección del método tiene que basarse en la naturaleza del cultivo y en las ventajas e inconvenientes del método escogido. Si el microorganismo aún no se conoce del todo es aconsejable utilizar varios métodos de conservación (Dhingra y Sinclair 1985)

Los cultivos de microorganismos se siembran en medios estériles y en condiciones de asepsia y se mantienen activos aplicando alguno de los siguientes métodos:

- Reduciendo o controlando su actividad metabólica a través de la refrigeración. Este método solo es aplicable durante períodos cortos de almacenaje (por ejemplo en medios líquidos o tubos inclinados de agar nutritivo).
- Conservación mediante: congelación y deshidratación.

Normalmente se concentran o se separan de los productos residuales de su metabolismo, a continuación se resuspenden en el medio estéril y se procede a la etapa final de conservación por alguno de los dos métodos mencionados.

Este sistema permite mantener los cultivos durante largos periodos de tiempo y la viabilidad de los cultivos depende de:

- El medio de cultivo base.
- El método de concentración.
- La rápida eliminación de los metabolitos.
- La naturaleza del medio de suspensión.
- Las condiciones de deshidratación o congelación.
- La presencia de agentes crioprotectores.
- La velocidad de descongelación (Dhingra y Sinclair 1985).

### **2.6.1. Conservación en refrigeración**

El objetivo general de la refrigeración es incrementar la vida útil de los cultivos y en consecuencia incrementar sus posibilidades de conservación (Casp y Abril 1999).

### 2.6.2. Conservación por congelación

Se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento (Hatt 1980).

La mayor tasa de destrucción bacteriana se observa inmediatamente tras la congelación, después se reduce notablemente y llega a estabilizarse durante largos períodos de tiempo. Por eso aunque el número de supervivientes disminuya, la congelación es un método efectivo para mantener la viabilidad de las bacterias. Cuanto menor sea la temperatura de almacenamiento, mayor será la supervivencia de las bacterias (Ordoñez *et al.* 1998).

El principal problema del mantenimiento de microorganismos a temperaturas por debajo del punto de congelación es la muerte durante los procesos de congelación y descongelación. Si los microorganismos pueden sobrevivir a temperaturas del orden o por debajo de  $-20^{\circ}$  C seguidas de un recalentamiento rápido hasta la temperatura ambiente es posible conservarlos congelados.

La supervivencia de los microorganismos a los procesos de congelación y descongelación dependen de:

- El número inicial de células viables.
- La tasa de congelación y descongelación.
- La temperatura de congelación y almacenamiento.
- Tiempo de almacenamiento.

- Presencia de protectores físicos.

Los principales inconvenientes de este sistema son los costos de los equipos y del mantenimiento, y los daños mecánicos que pueden provocar en las células (Dhingra y Sinclair 1985).

### **2.6.3. Conservación en Nitrógeno líquido (-196°C)**

La actividad metabólica de los microorganismos puede ser reducida considerablemente almacenándolos a temperaturas muy bajas (-196° C) lo cual se puede lograr utilizando la refrigeración con nitrógeno líquido. Según Stanbury *et al.* (1995), este es el método más adecuado para la mayoría de células, propuso la congelación con nitrógeno líquido como técnica idónea o alternativa para conservar por largos períodos aquellas células que no sobreviven al proceso de liofilización. Sin embargo, el equipo es caro aunque el proceso es económico. El mayor inconveniente es que el nitrógeno líquido se evapora y debe ser reemplazado regularmente. A demás si el equipo falla la consecuencia puede ser la pérdida de la colección.

### **2.6.4. Conservación por deshidratación**

Generalmente, se considera como deshidratación un procedimiento que le permite eliminar por vaporización o sublimación la mayor parte del agua de un producto líquido o sólido. Por el contrario, la concentración (por evaporación, congelación, filtración, a través de una membrana, concentración osmótica, centrifugación, prensado mecánico, extracción de agua por disolventes) solo retira cierta proporción de esa agua. La

concentración constituye, a veces, una fase a la deshidratación de productos líquidos (Cheftel *et al.* 1992).

### **2.6.5. Liofilización**

Llamada anteriormente crio-desección, la liofilización, cuyo nombre procede de la industria farmacéutica, es un proceso de secado cuyo principio consiste en sublimar el hielo de un producto congelado. El agua del producto pasa, por tanto, directamente del estado sólido al estado de vapor, sin pasar por el estado líquido (Casp y Abril 1999).

El proceso de liofilización consiste esencialmente en dos etapas:

1. El producto se congela.
2. El producto se seca por sublimación directa del hielo bajo una presión reducida (Barbosa-Cánovas y Vega Mercado 2000).

**1. Fase de solidificación:** la mayor parte del agua que contiene el producto se congela en forma de cristales de hielo (agua prácticamente pura), mientras que el agua no congelada y los solutos se quedan en forma amorfa llamada fase vítrea. Es imprescindible la congelación completa de la muestra, que se puede realizar previamente a la introducción del material dentro del liofilizador o dentro del mismo liofilizador.

La forma y características del producto al final del proceso serán esencialmente idénticas a las originales ya que la estructura queda fijada durante estas etapas de congelación.

**2. Fase de deshidratación:** se pueden distinguir dos subetapas:

**a. Desecación primaria o sublimación:** consiste en la sublimación de los cristales de hielo de manera que sólo queda la fase con estructura porosa ( los poros dejados por el agua sublimada)

Esta etapa se realiza en condiciones por debajo del punto triple del agua (punto donde coexiste agua, hielo y vapor) para evitar el paso por la fase líquida, de manera que es un proceso ideal para los productos termolábiles ya que puede deshidratar a bajas temperaturas porque trabaja a presiones inferiores a 610 Pa.

Es necesario un vacío elevado (baja presión absoluta) en el liofilizador para favorecer la sublimación, cuando la presión de vapor sobre el hielo disminuye, lo que hace también la temperatura y son necesarias presiones bajas para que sublime el hielo.

La sublimación del hielo comienza cuando se produce el vacío y disminuye la presión del sistema por debajo de la presión de vapor de hielo a la temperatura del producto. Para sublimar el hielo tiene que absorber el calor latente del sistema (aprox. 650 calorías/gramo) que se tiene que proporcionar en forma de calor. Si no es así el material experimenta un enfriamiento progresivo que provoca la disminución de la tensión de vapor y no se produce la sublimación.

**b. Desecación secundaria o desorción:** el agua no congelada se traslada hacia la superficie y sale fuera de la matriz vítrea. Hace falta aportar la energía necesaria para provocar la desorción del agua absorbida o fijada por la matriz.

Para eliminar esta agua, se realiza una evaporación bajo vacío, manteniendo la misma presión, o menor, que durante la desecación

primaria y elevando la temperatura del producto. Generalmente este aporte de calor se hace desde el fondo del producto por conducción y en la parte superior por radiación.

Si la muestra queda suficientemente seca se puede mantener a temperatura ambiente.

Los productos liofilizados pueden volver a su estructura original por la adición de agua. La estructura esponjosa del producto liofilizado permite una rápida rehidratación del mismo. Las características del producto rehidratado son análogas a las que poseía el producto inicial (Barbosa-Cánovas y Vega Mercado 2000).

**Rehidratación:** consiste en la reconstitución del estado original por adición de agua o una solución acuosa. Los productos liofilizados son fácilmente rehidratable debido a que la estructura porosa facilita la penetración de agua ((Barbosa-Cánovas y Vega Mercado 2000, Casp y Abril 1999).

Según Casp y Abril (1999) la liofilización presenta una serie de ventajas:

- La temperatura de trabajo es muy baja y por lo tanto los productos termolábiles no se alteran.
- No existe peligro de oxidación por la ausencia de aire durante el procesado.
- No hay agua libre, por lo tanto no hay peligro de hidrólisis ni de crecimiento microbiano.



- Al evaporarse el hielo, quedan poros que permiten una rehidratación o reconstitución rápida.
- La humedad residual es baja.
- La duración de la conservación es larga.
- Son productos de peso ligero que no necesitan cadenas de refrigeración para su distribución.

Pero presentan algunos inconvenientes.

- El costo de las instalaciones y los equipos es muy elevado.
- Altos costos de energía.
- Proceso lento y largo (un ciclo habitual puede ser de 4- 8 horas para liofilizar 2 gramos de producto).

### **III.MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Materiales empleados en la fase de laboratorio**

Para realizar la toma de muestras de la planta procesadora de lácteos y la obtención de bacterias probióticas, se utilizaron los siguientes materiales:

- Fundas de plástico estériles.
- Jeringas de 10ml
- Recipiente con tapa
- Marcador permanente
- Guantes quirúrgicos

En la fase de laboratorio se realizó el aislamiento, purificación, caracterización y liofilización de bacterias, se emplearon los siguientes equipos, materiales y reactivos:

Los equipos utilizados fueron:

- Cámara de flujo laminar
- Balanza de precisión
- Microondas
- Autoclave
- Baño maría
- Refrigeradora
- Incubadora
- Liofilizador

La cristalería utilizada fue:

- Probetas
- Frascos con medida
- Mecheros
- Tubos de ensayo
- Portaobjetos
- Cajas de petri
- Viales para liofilizar
- Vasos de precipitación

Los reactivos empleados para la caracterización fueron:

- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol cetona
- Safranina
- Verde de malaquita
- Fucsina
- KOH al 3%
- Reactivo de oxidasa
- Peróxido de hidrogeno
- Tween 80

Se utilizaron medios de cultivos específicos para el aislamiento, purificación y conservación de bacterias que contenía el probiótico.

### **3.2. Materiales empleados en la fase de campo**

En la fase de campo, para evaluar los efectos del probiótico compuesto de *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* se utilizaron los siguientes materiales:

- Galpón
- Balanza
- Recipientes plásticos
- Cucharas
- Jarra con medida
- Gavetas
- Cartulinas de colores
- Balanceado para cuyes
- Forraje
- Melaza
- Probióticos liofilizados
- Cuyes destetados (14 días)
- Cuaderno de campo
- Hojas para registro de datos

### **3.3. Métodos utilizados en la fase de laboratorio**

#### **3.3.1. Localización geográfica**

La fase de laboratorio y conservación de los probióticos se realizó en el laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigaciones de la Carrera de Ciencias Agropecuarias (IASA I), ubicada a 2748 m.s.n.m, con una humedad relativa del 68% y

una temperatura media de 12°C, localizada en el cantón Rumiñahui de la provincia de Pichincha, Ecuador.

A demás se realizó una caracterización a nivel de especie de las bacterias aisladas en laboratorio del Centro de Investigaciones Microbiológicas y Control de Calidad (CIMICC), ubicado en la ciudad de Quito en la avenida 10 de Agosto y Bellavista.

### **3.3.2. Muestreo para la obtención de bacterias**

El muestreo para obtener bacterias se realizó en la planta procesadora de lácteos, tomando muestras de los barriles de leche, yogurt natural y el suero residuo de la elaboración del queso.

El procedimiento usado para el muestreo de leche y sus derivados fermentados consistió en sumergir una jeringa estéril de 50ml en los recipientes que contenían los productos lácteos procesados el día anterior al muestreo, con excepción de la leche que estaba cruda y fresca. Se tomaron tres muestras de cada uno de los productos de diferentes recipientes, una vez tomada la muestra se transfirieron a fundas estériles y luego a un recipiente con tapa para poderlas transportar inmediatamente al laboratorio.

### **3.3.3. Aislamiento y purificación de *Bacillus subtilis***

Para el aislamiento de bacterias de la leche se realizó un tratamiento térmico, sumergiendo las muestras tomadas en baño maría a 80° C por 15 minutos con la finalidad de favorecer a los microorganismos termoresistentes. Luego del tratamiento térmico se procedió a realizar diluciones empleando solución salina (NaCl al 1%) como

diluyente en una proporción 10:1 con respecto a la muestra de leche. Para las diluciones se añadió 10 ml de leche a 90ml de solución salina, realizándose diluciones sucesivas hasta  $10^{-4}$ , para obtener un desprendimiento mayor de los microorganismos se agitó la solución y finalmente con una asa de transferencia se sembró cada una de las diluciones en cajas de petri con medio PCA y se incubó de 24 – 48 horas a 37°C, hasta observar el apareamiento de colonias.

Para purificar se seleccionó las colonias que presentaban características del género *Bacillus*, siendo las siguientes:

- Bordes irregulares.
- Color blanco a crema
- Rugosas
- Colonias grandes.

Una vez seleccionadas las colonias se transfirieron a tubos con PCA inclinado se incubó de 24 – 48 horas a 37° C, finalmente a los tubos con las bacterias se les añadió aceite de vaselina estéril para mantener un respaldo en refrigeración.

#### **3.3.4. Caracterización de *Bacillus subtilis***

Las bacterias obtenidas luego del aislamiento y la purificación se sometieron a pruebas de bioquímicas y morfológicas, con la finalidad de encontrar su identidad. Estos datos fueron comparados con los datos del Manual de Bergey's (1986).

#### **3.3.4.1.Prueba de tratamiento térmico**

Los cultivos puros de la bacteria que se va a caracterizar se sembraron en tubos con caldo nutritivo y se incubaron a 24°C por 24 horas. El tubo con el caldo y la bacteria desarrollada se sumergieron en el baño maría a 80°C por 10 minutos, concluido el tratamiento térmico, se procedió a sembrar el contenido en tubos de PCA inclinado, se incubó por 48 horas a 24°C, finalmente se evaluó resultando positiva si existe crecimiento bacteriano y negativa en caso contrario.

#### **3.3.4.2.Morfología**

Tomando pequeñas cantidades de biomasa de los cultivos puros se estirió en cajas de petri con PCA, para obtener colonias aisladas, se incubó por 24 horas a 24°C y se evaluaron las características macroscópicas (a simple vista), las características que se observaron fueron: forma, borde, color y elevación de cada una de las colonias formadas en las cajas.

#### **3.3.4.3.Tinción Gram**

Para esta prueba fue necesario refrescar los cultivos bacterianos, es decir se trabajó con cultivos de 24 horas de la bacteria a caracterizarse en PCA, para esta prueba fue necesario trabajar en la cámara de flujo laminar, puesto que se manipuló cultivos bacterianos y agua estéril a fin de evitar posibles contaminaciones.

El procedimiento para esta prueba consistió en colocar una gota de agua estéril en un portaobjetos, luego se tomó una pequeña cantidad de biomasa bacteriana y se expandió en el centro del portaobjetos, se fijó la muestra mediante calor flameando la muestra

sobre el fuego del mechero 2 a 3 veces. Se añadió sobre la muestra fijada cristal violeta, se dejó 1 minuto y se enjuagó la placa con agua corriente. Se cubrió la muestra con lugol y se dejó en contacto 1 minuto y se lavó la muestra. Posteriormente se hizo un lavado con alcohol cetona hasta que se retire el cristal violeta, finalmente se añadió safranina durante 1 minuto y se lavó todo el exceso de este reactivo, se esperó que se seque totalmente la muestra para poder realizar observaciones al microscopio. Por último se evaluó la coloración de las bacterias, teniendo en cuenta que las bacterias de color violeta intenso son Gram positivas y las de coloración rosa son Gram negativas.

#### **3.3.4.4. Tinción de esporas**

Esta prueba partió de cultivos bacterianos de 48 horas en PCA inclinado. Inicialmente se realizó un frotis en una placa portaobjetos, para lo cual se tomó una muestra de bacterias y se depositó sobre la gota de agua estéril en el portaobjeto. Se fijó la muestra mediante calor pasando la muestra varias veces por el fuego del mechero, posteriormente se añadió verde malaquita sobre toda la muestra fija. Se calentó la muestra hasta que emitiera vapores, luego se lavó la muestra con agua corriente. Se colocó eosina y se dejó actuar por 30 segundos. Finalmente se lavó y se secó la muestra para observar al microscopio, donde se pudo observar la posición de la espora de la bacteria a caracterizarse.

#### **3.3.4.5. Forma**

Mediante las observaciones de la tinción Gram convencional se logró también establecer la forma de las bacterias.



#### **3.3.4.6.Prueba de KOH al 3%**

Esta prueba se realizó a partir de cultivos bacterianos de 24 horas en PCA inclinado, la misma que consistió en colocar una gota de KOH al 3% sobre una placa portaobjetos. Luego se tomó una muestra de biomasa bacteriana y se mezcló con el KOH mediante el asa de platino. Posteriormente se procedió a levantar la mezcla y observar si se formó un filamento, si se forma el filamento la prueba resulta ser positiva de lo contrario la prueba es negativa.

#### **3.3.4.7.Oxidasa**

Para esta prueba se utilizó el procedimiento anterior, para el caso de la oxidasa el cambio de color del reactivo transparente a color púrpura indicaba un resultado positivo, caso contrario fue negativo.

#### **3.3.4.8.Catalasa**

Para realizar esta prueba se tomó 2 ml de cultivo fresco, se añadió 1 ml de Tween 80 al 1% en un tubo de ensayo de tapa rosca, se le adicionó 0.5 ml de peróxido de hidrógeno de 30 volúmenes y se cerró. La efervescencia indica asimilación de catalasa.

#### **3.3.4.9.Hidrólisis de almidón**

Para esta prueba se emplearon cultivos bacterianos en cajas de petri de 48 horas en PCA más almidón al 1%, se colocó lugol dentro de la caja que contenía la bacteria y se observó el cambio de coloración. El color blanquecino a violeta representó una prueba negativa, y la no coloración del medio es una prueba positiva.

### 3.3.4.10. Producción de ácido

A partir de cultivos frescos de 24 horas en PCA de las bacterias a caracterizar, por medio de un asa de transferencia se sembró la bacteria en el medio para producción de ácido. Se incubó a 24°C el medio y se realizó evaluaciones a las 24, 48 y 72 horas. Si el medio cambia de color se toma como resultado positivo, caso contrario son negativos.

El medio empleado fue:

INGREDIENTE	DOSIS g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g
KCl	0.2g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2g
Agar	15g
Extracto de levadura	0.2g
Glucosa	5g
Purpura de bromocresol	0.008g

### 3.3.4.11. Producción de gas

Se inició con cultivos bacterianos de 24 horas en PCA de las bacterias a caracterizar, por medio de una asa de platino se sembró la bacteria en el medio para producción de gas y se incubó a 24°C. Se tomo los resultados a las 24, 48 y 72 horas. Si existe la presencia de burbujas de aire el resultado es positivo, mientras que si no existe burbujas es negativo.

El medio empleado fue:

<b>INGREDIENTE</b>	<b>DOSIS g/L</b>
Peptona	5g
Extracto de levadura	3g
NaCl	5g
Agar	3g
Purpura de Bromocresol	0.008g
Glucosa	10g

#### **3.3.4.12. Producción de acetoína**

Se inicio con cultivos bacterianos de 24 horas en PCA de las bacterias a caracterizar, por medio de un asa de platino. Se sembró la bacteria en el medio para producción de gas y se incubó a 24°C, se tomo los resultados a las 24, 48 y 72 horas. Los resultados fueron positivos si existió crecimiento y negativos no existió cambio.

El medio empleado fue:

<b>INGREDIENTE</b>	<b>DOSIS g/L</b>
Proteosa peptona	7g
Glucosa	5g
NaCl	5g

### 3.3.4.13. Manitol

Para realizar esta prueba se emplearon cultivos bacterianos frescos (24 horas) de la bacteria a caracterizarse, mediante una asa de platino se sembraron en el medio que contenía manitol, esta prueba se evaluó el cambio de color.

El medio empleado fue:

<b>INGREDIENTE</b>	<b>DOSIS g/L</b>
Peptona	10g
Extracto de carne	1g
Cloruro de sodio	75g
D- manitol	10g
Rojo fenol	0.025g
Agar – agar	12g

### 3.3.4.14. Arabinosa

Para realizar esta prueba se emplearon cultivos bacterianos frescos de 24 horas de la bacteria a caracterizarse, mediante una asa de platino se sembraron en el medio que contenía arabinosa, esta prueba se evaluó el crecimiento de la bacteria.

El medio empleado fue:

<b>INGREDIENTE</b>	<b>DOSIS g/L</b>
Peptona	10g
Extracto de carne	1g
Cloruro de sodio	75g
Arabinosa	10g
Rojo fenol	0.025g
Agar – agar	12g

### 3.3.4.15. Glucosa

Para realizar esta prueba se emplearon cultivos bacterianos frescos (24 horas) de la bacteria a caracterizarse, mediante una asa de platino se sembraron en el medio que contenía glucosa, esta prueba se evaluó el cambio de color.

El medio empleado fue:

<b>INGREDIENTE</b>	<b>DOSIS g/L</b>
Peptona	10g
Extracto de carne	1g
Cloruro de sodio	75g
Glucosa	10g
Rojo fenol	0.025g
Agar – agar	12g

### 3.3.4.16. Tinción Ziel – Neelsen

Se realizó una tinción de Ziel – Neelsen en la cual se comprobó si las bacterias fueron ácido resistentes.

Esta prueba consistió en realizar un frotis en un portaobjetos cubrirlo con Fucsina y pasarlo por el mechero 2 o 3 veces hasta que forme vapores. Luego se dejó que el colorante actué por 5 minutos. Posteriormente se decolora con alcohol clorhídrico hasta que desaparecieron las nubes rojas. Luego se cubrió con azul de metileno por 1 minuto para finalmente lavar con agua y secar con aire para la observación al microscopio.

### **3.3.4.17. TSI (Triple Sugar Iron)**

El agar triple azúcar hierro es un medio que permitió determinar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa en un mismo medio. Mediante esta prueba también se pudo observar si existió producción de H<sub>2</sub>S.

El agar se colocó en los tubos de ensayo en forma inclinada para formar un pico de flauta. Esto determinó que existan dos cámaras de reacción dentro del mismo tubo. El pico que es la porción inclinada estuvo expuesta en toda su superficie al oxígeno es aerobia, mientras que el fondo estuvo protegido del aire permitiendo que existiera anaerobiosis.

Cuando se desarrolla un microorganismo en el TSI, el pico tiende a virar al pH alcalino (color rojo por el rojo fenol) por la producción de aminas, debido a la utilización aerobia de las peptonas.

En el fondo del tubo donde no existe oxígeno la degradación de peptonas es menor y no se generaron aminas, de manera que se pudo detectar la producción de pequeñas cantidades de ácido (color amarillo por el rojo fenol). Si se inoculan microorganismo no fermentadores no se formarán ácidos, pero por la producción de aminas en el pico, todo el medio quedaría rojo.

La producción de H<sub>2</sub>S es partir de tiosulfato, existiendo la presencia de un precipitado de color negro en el fondo del tubo de ensayo con TSI.

Medio empleado fue:

INGREDIENTE	DOSIS g/l
Extracto de carne	3g
Extracto de levadura	3g
Peptona	15g
Proteosa peptona	5g
Lactosa	10g
Sacarosa	10g
Glucosa	1g
Cloruro de sodio	5g
Sulfato ferroso	0,2g
Tiosulfato de sodio	0,3g
Agar	12g
Rojo fenol	0,024g
Agua destilada	1L
pH = 7,4 ± 0,2	

Las pruebas anteriores se realizaron en los laboratorios de Control Biológico de la Carrera de Ciencias Agropecuarias IASA, y partir de estas pruebas se determinó el género de las bacterias, posteriormente se envió las muestras al laboratorio CIMICC con la finalidad de complementar los resultados obtenidos en el IASA, donde se realizaron las siguientes pruebas: lecitinasa, utilización de citrato, crecimiento anaeróbico, producción de acetoina, reducción de nitrato, crecimiento en 7% de cloruro de sodio, hidrólisis de almidón, caseína y gelatina, ureasa, utilización del propionato, reacción de indol, manitol y glucosa, mediante los resultados des estas pruebas se determinó que la bacteria era *Bacillus subtilis*.

### **3.3.5. Aislamiento y purificación de *Lactobacillus acidophilus***

El aislamiento de bacterias presentes en yogurt y el suero de leche, se realizó con el procedimiento anterior, pero las muestras de estos productos no recibieron tratamiento

térmico debido a que los *Lactobacillus* no forman esporas por lo tanto no resistirían la temperatura empleada en el baño maría. Para este aislamiento se empleó el medio de cultivo denominado MRS, puesto que este medio es selectivo para *Lactobacillus*. La selectividad del medio se incremento mediante la adición de fosfomicina, la cual inhibe el desarrollo de los Streptococos lácticos.

Una vez desarrolladas las colonias en las cajas de petri con MRS, se procedió a seleccionar las colonias que presentaban las siguientes características:

- Borde uniforme y liso
- Densas
- Tamaño grande.

La purificación se realizó en tubos de ensayo con MRS y nuevamente se incubó a 37°C durante 24 - 48 horas, por último a los tubos con las bacterias se les añadió aceite de vaselina estéril para mantener un respaldo en refrigeración.

### **3.3.6. Caracterización de *Lactobacillus acidophilus***

A partir de los cultivos puros se realizo las pruebas descritas anteriormente, las mismas que se realizaron en el laboratorio de Control biológico de la Carrera de Ciencias Agropecuarias IASA a excepción del tratamiento térmico, una vez que se obtuvo el género de la bacteria de igual manera se envió los cultivos bacterianos al laboratorio CIMICC, donde se corrió el test api 50 CHL.



### ➤ API 50 CHL

Medio listo al empleo, permite el estudio de la fermentación de 49 azúcares de la galería API 50 CH.

El microorganismo a estudiar fue puesto en suspensión en el medio, después se inoculó cada tubo de la galería. Durante la incubación el catabolismo de glúcidos conduce a ácidos orgánicos que provocan el viraje del indicador de pH. Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico de la cepa y sirven para su identificación

#### **3.3.7. Liofilización de las bacterias**

Para realizar este procedimiento, se propagó masivamente cada una de las bacterias en los medios específicos, se incubó por 72 horas a 37° C, mediante un bisturí, una jeringa de 10 ml y la solución Buffer fosfato. Se procedió a la recolección de la biomasa formada en cada una de las cajas de petri. Luego esta biomasa fue colocada en tubos al vacío. Posteriormente se procedió a agitar las muestras durante 15 minutos a 160 RPM a 15°C. Se procedió a centrifugar las muestras a 6981 g por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y para fortalecer a las bacterias para que resistan el proceso de liofilización se las enriqueció mediante soluciones de sucrosa al 1%, 5% y al 10 % agitando y centrifugando con las mismas condiciones anteriores. Con la solución de sucrosa al 10% se procedió a la liofilización de *Bacillus subtilis*, pero antes de transferir la biomasa enriquecida a los viales de liofilización, en cada uno de los viales se colocó 3 g de fécula de maíz (maicena), con la finalidad de poder extraer las bacterias del vial y pesarlas para suministrar a los cuyes, en cada uno de los viales se colocó el excipiente más 5 ml de la bacteria con la sucrosa.

Para el caso de *Lactobacillus* se elaboró una variante, puesto que este para su conservación necesitaba leche, se añadió a la solución de sucrosa al 10% leche descremada en polvo, en cada uno de los viales se colocó el 5 ml de las bacterias más la solución de sucrosa, luego se congeló las muestras a -20° C por 24 horas y por último se liofilizó empleando el liofilizador por 24 horas.

Los liofilizados se mantuvieron refrigerados a temperaturas bajo cero para conservar las características de las bacterias al momento de suministrárselas a los cuyes.

### **3.3.8. Pruebas de calidad del probiótico**

Estas pruebas se la realizó tomando muestras de liofilizados al inicio y al final de la investigación, a fin de determinar la viabilidad de las bacterias.

Para realizar esta prueba se tomó un gramo de liofilizado y se colocó en 9ml de agua estéril consecuentemente se procedieron a realizar diluciones hasta  $10^{-7}$ , finalmente se tomó 20 microlitros de cada una de las diluciones y se sembró en los medios específicos para *B. subtilis* y *L. acidophilus* finalmente se incubó a 37° C por 24 horas y se procedió a contar las colonias presentes.

Para la siembra primero se colocó los 20 microlitros en el fondo de la caja de petri, luego se dispersó el medio de cultivo a una temperatura de 45° C, se esperó que se solidifique, se incubó a 37° C por 24 horas y se efectuó el conteo de las colonias existentes para poder determinar la concentración del probiótico.

### **3.3.9. Pruebas de sobrevivencia de las bacterias a la melaza**

Para esta prueba se esterilizó la melaza y se colocó en 9 ml de melaza un gramo de liofilizado de las bacterias probióticas y se ejecutó el procedimiento igual que en el caso anterior y finalmente se contaron las colonias formadas dentro de las cajas a fin de establecer la concentración en las cuales las bacterias fueron suministradas a cada uno de los tratamientos en estudio.

### **3.3.10. Pruebas de sobrevivencia de las bacterias al aparato digestivo del cuy.**

Para esta prueba se tomaron heces frescas de cuy, se realizó diluciones colocando 10g de heces de cuy en 90 ml de agua estéril, se efectuó diluciones hasta  $10^{-7}$ , posteriormente se sembraron cada una de las diluciones en medios selectivos para *B. subtilis* y *L. acidophilus*.

## **3.4. Métodos empleados en la fase de campo**

### **3.4.1. Localización geográfica**

La fase de campo se la ejecutó en el galpón de cuyes ubicado en las instalaciones de la Carrera de Ciencias Agropecuarias IASA. El cual mantiene las mismas condiciones climáticas mencionadas en la fase de laboratorio.

### 3.4.2. Factores en estudio

➤ **G<sub>1</sub>**= *Lactobacillus acidophilus* (cepa 1) en una dosis de 50 mg con una concentración de  $1 \cdot 10^{10}$  de bacterias totales de *Lactobacillus acidophilus* por kilogramo de concentrado suministrado.

➤ **G<sub>2</sub>**= *Bacillus subtilis* (cepa 2) en una dosis de 50 mg con una concentración de  $1 \cdot 10^{10}$  de bacterias totales de *Bacillus subtilis* por kilogramo de concentrado suministrado.

### 3.4.3. Tratamientos.

El factor en estudio genera tres tratamientos que consistieron en:

➤ Forraje + Balanceado + melaza + probiótico a base de *Lactobacillus acidophilus*.

➤ Forraje + Balanceado + melaza + probiótico a base de *Bacillus subtilis*

➤ Forraje + Balanceado + melaza.

#### 3.4.3.1.Descripción de los tratamientos

Los tratamientos a evaluarse fueron del resultado de emplear dos géneros de bacterias con una concentración de bacterias totales igual para ambos géneros y una misma dosis para los dos tratamientos, establecida de acuerdo al estudio realizado en pollos más un testigo, en el cual no se colocara liofilizado.

TRATAMIENTOS	NOMENCLATURA	DESCRIPCIÓN
T1	L	50 mg con una concentración de $1 \cdot 10^{10}$ de bacterias totales de <i>Lactobacillus acidophilus</i> por kilogramo de concentrado suministrado
T2	B	50 mg con una concentración de $1 \cdot 10^{10}$ de bacterias totales de <i>Bacillus subtilis</i> por kilogramo de concentrado suministrado
T3	T	Sin adición de aditivo

### 3.4.3.2. Diseño experimental

#### 3.4.3.2.1. Tipo de diseño

En la investigación se empleará un diseño completamente al azar en análisis grupal

##### a) Número de repeticiones

Cada tratamiento constó de cuatro repeticiones

##### b) Características de las unidades experimentales

La unidad experimental estuvo constituida por 12 cuyes

##### Número:

- 12 unidades experimentales

##### Área de ensayo:

- Área total del ensayo:  $18\text{m}^2$ .

##### c) Forma

La forma de las unidades experimentales será rectangular.

### 3.4.3.2.2. Distribución de parcelas en el área experimental

Se trabajará en 12 pozas de 1.50m \* 1.00m distribuidas al azar de la siguiente manera:

T <sub>2</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>3</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>3</sub> R <sub>3</sub>	T <sub>2</sub> R <sub>4</sub>
T <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>2</sub> R <sub>3</sub>	T <sub>3</sub> R <sub>4</sub>
T <sub>3</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> R <sub>3</sub>	T <sub>1</sub> R <sub>4</sub>

### 3.4.3.2.3. Esquema del Análisis de Varianza (ADEVA)

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
TOTAL	11
TRATAMIENTOS	(2)
T3 vs. T1, T2	1
T1 vs. T2	1
ERROR	9

### 3.4.3.3. Análisis Funcional

Para el análisis funcional, se realizó la Prueba de Duncan al 5%, a demás se realizó el establecimiento de las curvas de crecimiento para cada uno de los tratamientos en estudio.

### 3.4.4. Animales y alojamiento

Las pruebas de efectividad de bacterias probióticas se realizaron en cuyes en la etapa de engorde, el ensayo se cumplió en un solo ciclo. Se suministro diariamente el probiótico a los cuyes mezclado con el balanceado.

Se emplearon un total de 144 cuyes entre hembras y machos destetados a los 14 días de edad, de las líneas Inti, Perú y Andina. Una vez destetados y sexados se procedieron a pesar a los animales en forma individual a fin de que dentro de cada tratamiento exista igualdad entre los pesos de cada uno de los animales, posteriormente se formaron grupos de 12 animales y dispusieron en las pozas correctamente identificadas que contiene heno como cama para los animales. Las pozas disponían de comederos y espacios para colocar el forraje. Todos los tratamientos tuvieron las mismas condiciones climáticas, que en este caso fueron las condiciones ambientales normales que se presentaban cada día.

Las pozas fueron desinfectadas pozas con Acarmic en dosis de 1ml/litro de agua a fin de evitar problemas con los ectoparásitos, la limpieza de las pozas se realizó semanalmente y consistió en retirar los desechos de los cuyes, desinfectar la poza y lavar los comederos.

#### **3.4.5. Suministró de la alimentación de cuyes tratados con probióticos**

El suministro del probiótico se realizó diariamente, para lo cual se utilizó agua estéril para disolver el liofilizado, mezclar con la melaza y por último se mezcla con el balanceado a fin de no alterar la alimentación normal de los cuyes y asegurar de que el probiótico se distribuyo uniformemente.

Para establecer la cantidad de alimento que consumen los cuyes diariamente se tomó los datos sugerido por (Moncayo 2002) y de acuerdo a estos datos se peso el probiótico.

Para la manipulación del probiótico se empleó la cámara de flujo laminar a fin de evitar contaminaciones, diariamente se procedió a pesar el probiótico y a disolverlo con el agua estéril, esto se realizó en el laboratorio de Control biológico de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, en el galpón se mezcló la solución de probiótico con el balanceado y se suministró a cuyes en tratamiento.

Para la cantidad de forraje se tomó los datos sugeridos por Moncayo, pero se determinó falta de fibra para los cuyes, por lo que se realizó unos ajustes en esos datos, es decir se aumento la cantidad de forraje.

El forraje se cortó en la tarde con la finalidad de dejar orear toda la noche para que reduzca humedad que contiene y no causar problemas digestivos en los cuyes, el forraje se pesó en la balanza y se administró a los cuyes.

Tanto la cantidad de forraje como la cantidad de balanceado se aumentaron semanalmente.

#### **3.4.5.1.Cálculos para suministrar el probiótico mas balanceado**

Se calcularon las dosis de melaza, balanceado, agua para dilución de la melaza de acuerdo cantidades tradicionales empleadas para preparar un saco de balanceado de 45kg.

##### **Dosis de los productos:**

- Balanceado 45 Kg
- Melaza 15 L
- Agua 4 L



Con los datos anteriores se realizó una relación de acuerdo al consumo diario para los cuyes tratados.

La cantidad de probiótico se suministró de acuerdo a la dosis de 50 mg por kg de balanceado suministrado este dato se obtuvo de acuerdo al consumo diario de los cuyes.

#### **3.4.6. Variables a evaluarse**

Los datos de consumo de materia seca y mortalidad se registraron diariamente, mientras que los datos de ganancia de peso y la conversión alimenticia se tomaron semanalmente y los datos de rendimiento a la canal establecieron al final del ciclo, que en este caso fue a la 11<sup>va</sup> semana.

##### **➤ Consumo de materia seca**

Este dato se lo tomó diariamente, se les suministraba el concentrado preparado y el forraje de acuerdo a lo establecido por Moncayo y al siguiente día se pesaba el sobrante llegando a determinar el consumo de alimento.

Para el dato de materia seca solo se tomó el aporte de materia seca por parte del balanceado que fue de 84.40%, mientras que el aporte de materia seca por parte del forraje fue de 17.87%, debido a que su mayor contenido es agua con el 82.13%.

Finalmente se sumó el aporte de materia seca aportada por parte del balanceado y forraje para obtener el consumo real de materia seca.

### ➤ **Mortalidad**

Igual que el caso anterior se lo registró diariamente, para esto solo se revisaba la existencia de animales muertos dentro de las pozas. En caso de haber mortalidad se procedió a realizar la necropsia a fin de establecer las posibles causas de la muerte del animal.

### ➤ **Ganancia de peso**

Este dato se evaluó semanalmente, el cual consistió en pesar a los animales de cada una de las pozas y eso peso restarlo de la semana anterior.

### ➤ **Conversión alimenticia**

Para la obtención de este dato se necesitó el consumo de alimento a la semana y la ganancia de peso semanal, simplemente se divide lo consumido para lo ganado y se conoce el dato de la conversión

### ➤ **Rendimiento a la canal**

Para obtener este dato fue necesario sacrificar a los animales de cada uno de los tratamientos y repeticiones, se seleccionó una muestra significativa para cada tratamiento se tomó tres cuyes al azar cada una las pozas, por cada tratamiento 12 cuyes.

Antes de sacrificar a los cuyes se les pesó individualmente y este peso se lo denomina peso inicial, luego se toma el peso del animal sin pelo, sin vísceras y este es el peso final, para obtener el rendimiento a la canal solo se resta el peso inicial menos el peso final.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Fase de laboratorio

#### 4.1.1. Aislamiento y purificación de colonias bacterianas

Una vez aisladas y purificadas las colonias bacterianas se obtuvieron 9 aislados con características de *Lactobacillus acidophilus* y 9 aislados con características de *Bacillus subtilis*. Todos los aislados bacterianos fueron procedentes de la leche del rejo del IASA así como del yogurt y queso elaborados en la planta procesadora de lácteos del IASA.

Los aislados fueron identificados de la siguiente manera:

**Cuadro 4.1.1.1 Productos de procedencia y codificación de los aislados bacterianos. IASA, Ecuador, 2008**

Código	Producto	Código	Producto
LB L <sub>1</sub>	LECHE	B L <sub>1</sub>	LECHE
LBL <sub>2</sub>	LECHE	BL <sub>2</sub>	LECHE
LBL <sub>3</sub>	LECHE	BL <sub>3</sub>	LECHE
LBY <sub>1</sub>	YOGURT	BY <sub>1</sub>	YOGURT
LBY <sub>2</sub>	YOGURT	BY <sub>2</sub>	YOGURT
LBY <sub>3</sub>	YOGURT	BY <sub>3</sub>	YOGURT
LBS <sub>1</sub>	SUERO DE LECHE	BS <sub>1</sub>	SUERO DE LECHE
LB <sub>2</sub>	SUERO DE LECHE	B <sub>2</sub>	SUERO DE LECHE
LB <sub>3</sub>	SUERO DE LECHE	B <sub>3</sub>	SUERO DE LECHE

#### 4.1.2. Caracterización de los aislamientos bacterianos

Una vez concluidas las pruebas bioquímicas y morfológicas en el Laboratorio de Control Biológico de la Carrera de Ciencias Agropecuarias IASA se obtuvieron los siguientes resultados:

- La forma de la colonia fue irregular, de color crema y de borde rugoso
- Las bacterias tuvieron forma de bastones
- En la tinción gram las bacterias fueron de color violeta
- Las esporas de las bacterias fueron ovales, centrales y subterminales
- La prueba de KOH al 3% fue negativa
- Los resultados de la prueba de oxidasa fueron tardíos
- La prueba de catalasa fue positiva
- La hidrólisis de almidón fue positiva
- Las pruebas de manitol, arabinosa y glucosa fueron positivas
- No se obtuvo formación de H<sub>2</sub>S

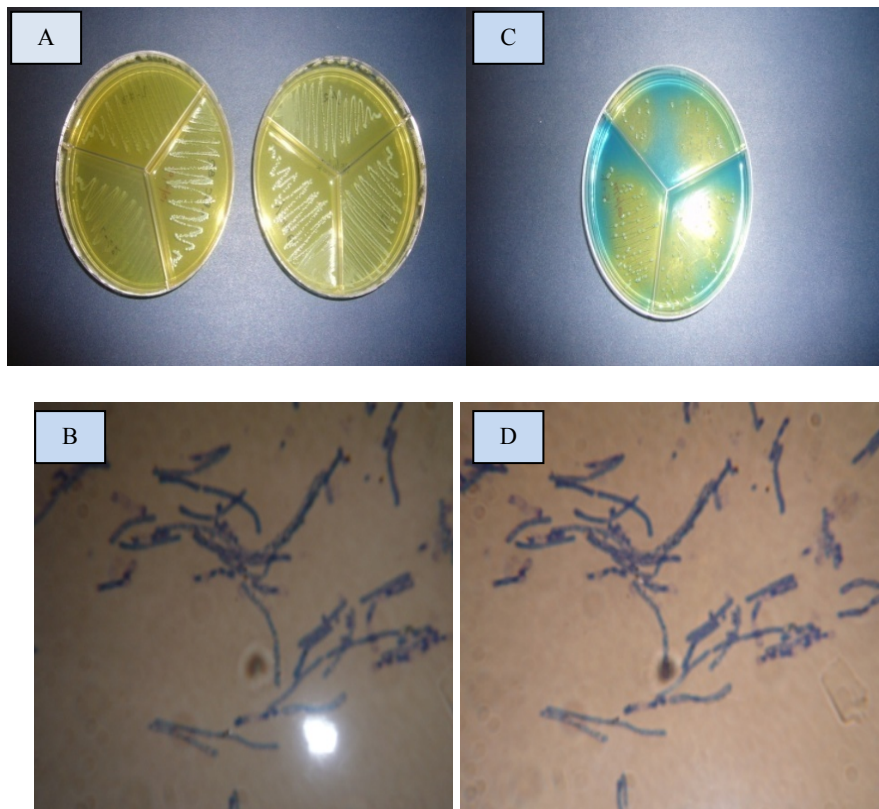
#### ❖ Estas cepas se precaracterizaron como *Bacillus subtilis*

- La forma de la colonia fue irregular de borde uniforme y liso
- Las colonias fueron densas
- Las bacterias tuvieron forma de bastones
- Las bacterias no formaban esporas
- La prueba de KOH al 3% fue negativa
- Los resultados de la prueba de oxidasa fue negativa
- La prueba de catalasa fue negativa
- No obtuvo formación de H<sub>2</sub>S

#### ❖ Estas cepas se precaracterizaron como *Lactobacillus acidophilus*. (Anexo 1)

Estos resultados se compararon con el manual de Bergey's (1986) con la finalidad de caracterizar las bacterias buscadas. Luego de una primera caracterización las cepas se enviaron al Centro de Investigaciones Microbiológica y Control de Calidad (CIMICC) para complementar la caracterización a nivel de especie.

Una vez obtenidos los resultados de las pruebas realizadas en el CIMICC, se determinó la existencia de 2 cepas de *Bacillus subtilis* y una cepa de *Lactobacillus acidophilus*, a partir de estas cepas se obtuvo los liofilizados (Anexo 2).



**Figura 4.2.1.1. Colonias de *B. subtilis* (A) Tinción Gram de *B. subtilis* (B) Colonias de *L. acidophilus* (C) Tinción Gram *L. acidophilus* de (D). IASA, Ecuador, 2008.**

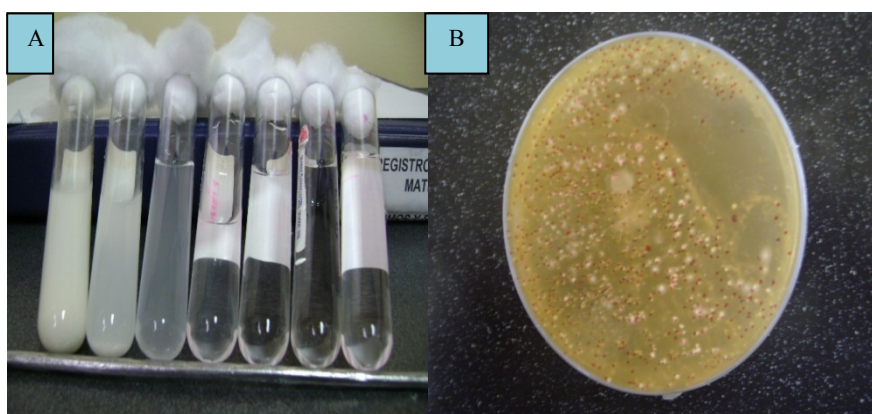
### 4.1.3. Control de calidad de aislamientos de los liofilizados

Los resultados obtenidos luego de realizar las pruebas de calidad de los probióticos suministrados a los cuyes tratados fueron excelentes, debido a que la concentración de las bacterias fue bastante alta, por lo cual se pudo asegurar que el probiótico suministrado a los cuyes contenía bacterias viables.

En los siguientes cuadros se demuestra que a medida que se incrementó la dilución para cada una de las bacterias, fue más fácil contar el número de colonias, esto implica que mientras más baja la dilución existe una mayor población bacteriana. Por tanto, la concentración en la solución madre fue la más alta.

**Cuadro 4.1.3.1. Población viable de *L. acidophilus* en pruebas de calidad de los liofilizados. IASA, Ecuador, 2008.**

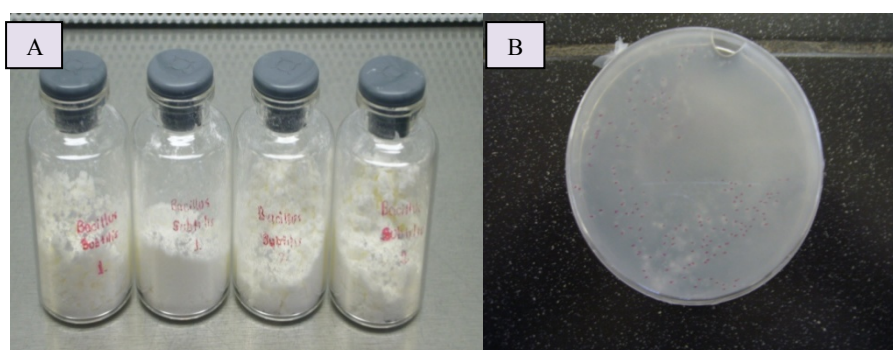
<i>Lactobacillus acidophilus</i>				
DILUCIÓN	Nº Colonias en MRS	ufc/g probiótico	Nº Colonias en MRS	ufc/g probiótico
10 <sup>-1</sup>	Caja llena	-	633	3.65*10 <sup>6</sup>
10 <sup>-2</sup>	Caja llena	-	327	1.6*10 <sup>8</sup>
10 <sup>-3</sup>	171	8.6*10 <sup>8</sup>	217	1.08*10 <sup>9</sup>
10 <sup>-4</sup>	139	6.9*10 <sup>10</sup>	130	6.5*10 <sup>9</sup>
10 <sup>-5</sup>	56	2.8*10 <sup>10</sup>	81	4.05*10 <sup>10</sup>
10 <sup>-6</sup>	26	1.3*10 <sup>11</sup>	56	2.8*10 <sup>11</sup>
10 <sup>-7</sup>	4	2*10 <sup>11</sup>	9	4.5*10 <sup>11</sup>



**Figura 4.1.3.1.2 Diluciones de liofilizado a base de *L. acidophilus* (A) Colonias de *L. acidophilus* en MRS (B). IASA, Ecuador, 2008.**

**Cuadro 4.1.3.2. Población viable de *B. subtilis* en pruebas de calidad de los liofilizados. IASA, Ecuador, 2008.**

<i>Bacillus subtilis</i>				
DILUCIÓN	Nº Colonias en PCA	ufc/g probiótico	Nº Colonias en PCA	ufc/g probiótico
10 <sup>-1</sup>	Caja llena	-	Caja llena	-
10 <sup>-2</sup>	Caja llena	-	Caja llena	-
10 <sup>-3</sup>	Caja llena	-	280	1.4*10 <sup>9</sup>
10 <sup>-4</sup>	Caja llena	-	242	1.21*10 <sup>10</sup>
10 <sup>-5</sup>	215	1.07*10 <sup>11</sup>	180	9*10 <sup>10</sup>
10 <sup>-6</sup>	122	6.11*10 <sup>11</sup>	130	6.5*10 <sup>11</sup>
10 <sup>-7</sup>	36	1.8*10 <sup>12</sup>	31	1.55*10 <sup>12</sup>



**Figura 4.1.3.2.1. Liofilizado de *B. subtilis* (A) Colonias de *B. subtilis* en PCA**

Se pudo determinar que la viabilidad de las bacterias empleadas como probiótico fue alta, sobrepasando 10<sup>10</sup> ufc/g de probiótico que fue la concentración a la que se planteó llegar, por tanto el suministro del producto a los cuyes en tratamiento fue de buena calidad (Cuadro 4.1.3.1. y 4.1.3.2).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Acurio (2007), quién demostró que con una técnica similar para conservación *B. subtilis* para control biológico, las bacterias luego del proceso de liofilización se mantuvieron altamente viable, puesto que al sembrarlas en agar arveja se presentaron un desarrollo masivo de colonias de *B. subtilis*.

La viabilidad del *L. acidophilus* liofilizado estuvo dentro del rango de  $6.5 \times 10^{11}$  a  $1.8 \times 10^{12}$  ufc/ml, por tanto los resultados de la viabilidad del probiótico a base de *L. acidophilus* están dentro de los estándares encontrados por Kirsop y Sneell (1984), quienes emplearon el método de liofilización para la conservación de lactobacilos y partiendo de una concentración inicial de  $5.7 \times 10^8$  ufc/ml con pérdidas de  $0.4 \times 10^8$  ufc/ml. Durante este proceso, ellos obtuvieron un conteo de bacterias viables de  $5.2 \times 10^8$  ufc/ml al primer año,  $5.0 \times 10^8$  ufc/ml a los cinco años,  $4.5 \times 10^8$  ufc/ml a los 10 años,  $4.6 \times 10^8$  ufc/ml a los 15 años y  $4.6 \times 10^8$  ufc/ml a los 20 años. Estos hechos demuestran la supervivencia de los lactobacilos al proceso de liofilización durante largos períodos de tiempo.

Guarner y Schaafsma (1998), afirma que la estabilidad y viabilidad bacteriana fue notablemente baja en preparaciones liofilizadas. Esta información no concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, ya que luego del conteo de las colonias se pudo determinar que existió alta viabilidad bacteriana.

#### **4.1.4. Pruebas de sobrevivencia de las bacterias al mezclarlas con melaza.**

La finalidad de esta prueba fue verificar si la melaza afectaba a la sobrevivencia de las bacterias. La melaza no afectó a las bacterias presentes en los liofilizados, ya que se mantuvo alta viabilidad tanto para *L. acidophilus* como para *B. subtilis* (Cuadro 4.1.4.1. y 4.1.4.2).



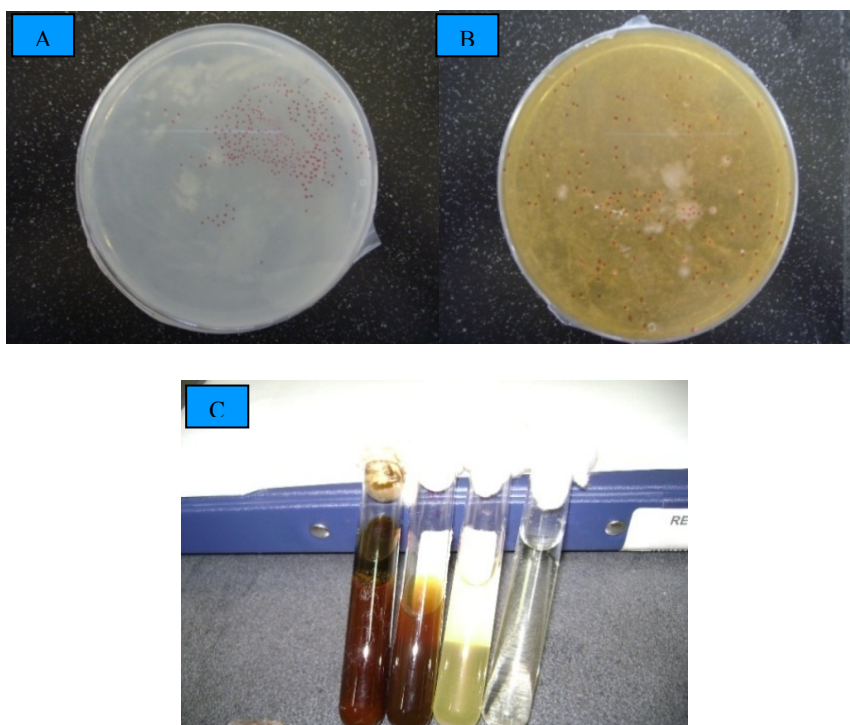
**Cuadro 4.1.4.1. Número de colonias de *L. acidophilus* al mezclar el probiótico con melaza. IASA, Ecuador, 2008.**

<i>Lactobacillus acidophilus</i>			
ELEMENTO	DILUCIÓN	Nº COL	ufc/gr probiótico
<i>L. acidophilus</i> + Melaza	10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-1</sup>	132	6.6*10 <sup>7</sup>
<i>L. acidophilus</i> + Melaza	10 <sup>-4</sup> , 10 <sup>-2</sup>	90	4.5*10 <sup>9</sup>

**Cuadro 4.1.4.2. Número de colonias de *B. subtilis* al mezclar el probiótico con melaza. IASA, Ecuador, 2008.**

<i>Bacillus subtilis</i>			
ELEMENTO	DILUCIÓN	Nº COL	ufc/gr probiótico
<i>Bacillus subtilis</i> + Melaza	10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-2</sup>	Caja llena	-
<i>Bacillus subtilis</i> + Melaza	10 <sup>-4</sup> , 10 <sup>-1</sup>	145	7.25*10 <sup>9</sup>

Los cuadros 4.1.4.1. y 4.1.4.2 demuestran que el probiótico suministrado a cuyes tratados contenía alta población de bacterias viables.



**Figura 4.1.4.3. Colonias de *B. subtilis* (A) Colonias de *L. acidophilus* (B) Diluciones bacterianas con melaza (C). IASA, Ecuador, 2008.**

Gómez (2004), buscó un medio de cultivo compatible con alimento concentrado para ganado vacuno, rico en azúcares ya que las bacterias ácido lácticas basan su mecanismo de crecimiento en la fermentación de azúcares reductores y de bajo costo. El demostró que al emplear melaza que contenía 60% de glucosa y 40% de sacarosa, como medio de cultivo para bacterias probióticas, la viabilidad de bacterias fue alta. Al realizar un conteo de las unidades formadoras de colonias, se determinó la viabilidad de células en el orden  $10^7$ /g.

Al comparar esta información con los resultados obtenidos en este estudio se confirmó que la viabilidad de las bacterias en la melaza también fue alta. El número de células viables para *L. acidophilus* se ubicó en un rango de  $6.6 \cdot 10^7$  a  $4.5 \cdot 10^9$  ufc/g y para *B. subtilis*  $7.25 \cdot 10^9$  ufc/g.

Clancy *et al.* (1995), reportaron que una dosis diaria de  $10^{10}$  bacterias probióticas vivas son necesarias para producir efectos benéficos en la salud del consumidor. De acuerdo a esta información la dosis de probiótico administrada en esta investigación a cuyes fue la correcta de  $10^9$  ufc/g para *L. acidophilus* y *B. subtilis*.

#### **4.1.5. Sobrevivencia de las bacterias en el aparato digestivo del cuy.**

Luego de inocular cada una de las diluciones de probiótico en medio selectivo para cada bacteria, se pudo determinar la presencia de colonias en las cajas de petri; pero no se pudo asegurar que estas bacterias fueron parte del probiótico suministrado; puesto que los mamíferos tienen naturalmente en su tracto intestinal bacterias pertenecientes a los géneros empleados como probióticos, sin embargo la presencia de colonias fue menor a las encontradas al realizar las pruebas de calidad de los liofilizados.

Antoine *et al.* (1994), Suarez y Álvarez (1991), afirman que en el estómago de mamíferos es posible encontrar cantidades importantes de *Lactobacillus* spp. Esto demuestra los resultados obtenidos en las pruebas de sobrevivencia de las bacterias en el aparato digestivo del cuy, puesto que al emplear las heces del cuy para realizar esta prueba se observó la existencia de colonias en el medio específico para *Lactobacillus* spp, pero no se pudo conocer el origen real de las bacterias encontradas.

Suskovic *et al.* (1997), demostraron mediante pruebas *in vitro* que la sobrevivencia de *L. acidophilus* es afectada al poner en contacto con la bilis deshidratada de buey al 0.15%, a pH 3,0, puesto que la bilis reduce la tasa de crecimiento de la bacteria. Luego de tres horas de exposición a la bilis el 60% de la población inicial de *Lactobacillus* sufre lisis total, por tanto en las pruebas de sobrevivencia de las bacterias empleadas para los probióticos no se pudo conocer el origen de las colonias presentes en el medio de cultivo, ya que las bacterias pudieron ser nativas del TGI o ya sea sobrevivientes del probiótico suministrado.

Los conocidos *Lactobacillus* colonizan el intestino humano y aparecen como competidores por sitios internos sobre las células epiteliales del intestino (Dunne *et al.* 1999), por tanto no se pudo confirmar el origen de los *Lactobacillus* encontrados en esta prueba.

Galdeano y Perdigón (2004), reportaron que los *Lactobacillus*, se adhieren a la mucosa intestinal y resisten a la bilis, generan antígenos que fortalecen el sistema inmune, ya que en estudio realizados en ratones de seis semanas se encontró que las bacterias probióticas estuvieron presentes en el lumen del intestino o en la superficie apical de las

células epiteliales, pero dentro de las células intestinales solo hubo partículas clasificadas de antígeno de bacteria, probablemente resultado de la degradación enzimática intestinal. Esto ratificó la presencia de bacterias al momento de realizar el conteo de colonias formadas en los medios que se realizaron las pruebas de sobrevivencia de las bacterias al TGI del cuy, por tanto no se pudo conocer el origen de las bacterias ya que pudieron ser nativas del TGI o provenientes del probiótico que se suministró.

## **4.2. Resultados de la fase de campo**

Para obtener los resultados de esta fase se analizaron las siguientes variables:

- Consumo de materia seca
- Ganancia de peso
- Conversión alimenticia
- Rendimiento a la canal

### **4.2.1. Consumo de materia seca**

Al establecer el análisis de variancia para el consumo de materia seca por los cobayos tratados con probióticos, no se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos durante 11 evaluaciones.

Las comparaciones entre los medios de los tratamientos de igual forma no presentaron diferencias significativas.

**Cuadro 4.2.1.1. Análisis de variancia para el consumo de materia seca en cuyes de engorde bajo el suministro de probióticos a base de *L. acidophilus* y *B. subtilis* para la fase de engorde. IASA, Ecuador, 2008.**

FUENTES DE VARIACION	G.L	CONSUMO DE MATERIA SECA SEMANAL ACUMULADA				
		3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>
TOTAL	11					
TRAT	2	23,73ns	165,87ns	657,97ns	1132,26ns	1876,30ns
T <sub>3</sub> VS T <sub>1</sub> T <sub>2</sub>	1	0,18ns	11,96ns	1,13ns	0,55ns	28,32ns
T <sub>2</sub> VS T <sub>1</sub>	1	47,29ns	319,79ns	1314,82ns	2263,97ns	3724,28ns
ERROR	9	23,60	255,01	1255,43	2409,80	4549,43
$\bar{X}$ (g)		184,85	468,70	824,65	1247,27	1733,24
C.V (%)		2,63	3,41	4,30	3,94	3,89

FUENTES DE VARIACION	G.L	CONSUMO DE MATERIA SECA SEMANAL ACUMULADA			
		8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>
TOTAL	11				
TRAT	2	3482,50 ns	7233,84 ns	13768,17 ns	18852,23 ns
T <sub>3</sub> VS T <sub>1</sub> T <sub>2</sub>	1	39,53 ns	3,22 ns	35,36 ns	609,03 ns
T <sub>2</sub> VS T <sub>1</sub>	1	6925,47 ns	14464,45 ns	27500,99 ns	37095,43 ns
ERROR	9	7180,63	10724,76	16260,26	23867,51
$\bar{X}$ (g)		2278,71	2880,80	3543,92	4173,34
C.V (%)		3,72	3,59	3,60	3,70

Los promedios del consumo de materia seca fueron de 184.85 g inicialmente, pero este consumo fue aumentando cada semana terminando en 4173.34 g. Los coeficientes de variación estuvieron en un rango de 2.63 a 4.30% que se consideran adecuados para este tipo de investigación (Cuadro 4.2.1.1.).

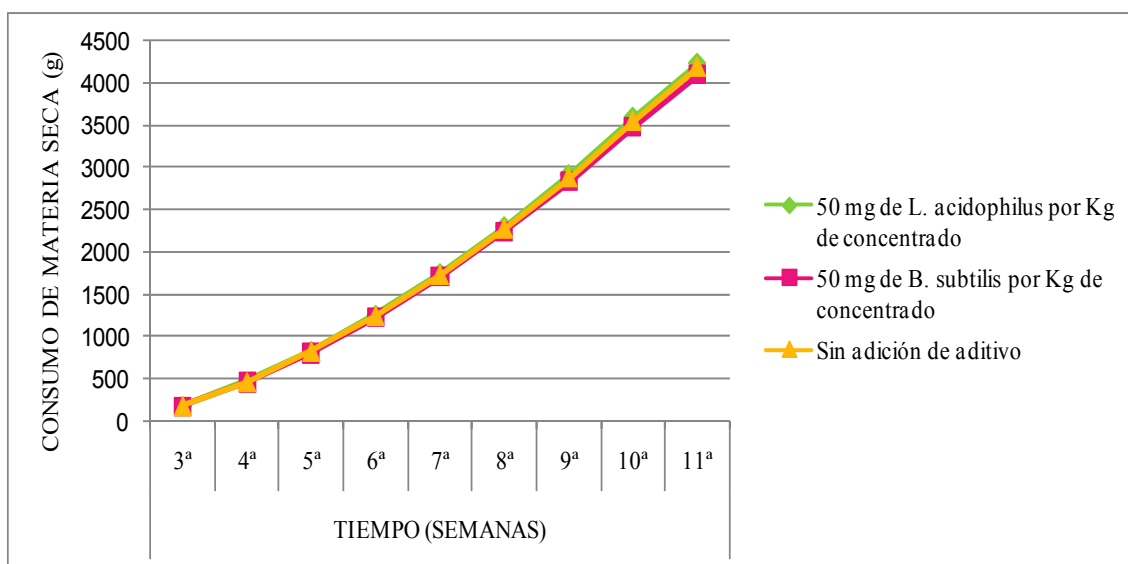
Al evaluar los tratamientos se pudo apreciar que la adición de 50 mg de *B. subtilis* por Kg de balanceado suministrado a cuyes, resultó en un menor consumo de materia seca durante 11 evaluaciones realizadas en esta investigación, mientras que el suministro de 50 mg de *L. acidophilus* por Kg de balanceado presentó los consumos de materia seca mas elevados durante todas las evaluaciones (Cuadro 4.2.1.2).

**Cuadro 4.2.1.2. Efecto de la administración de probióticos a base de *L. acidophilus* y *B. subtilis* sobre el consumo de materia seca en cuyes de engorde.**

TRATAMIENTOS	CONSUMO DE MATERIA SECA SEMANAL ACUMULADA (g)				
	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>
50 mg de <i>L. acidophilus</i> por Kg de concentrado	187,43	475,73	837,69	1263,94	1755,90
50 mg de <i>B. subtilis</i> por Kg de concentrado	182,57	463,09	812,05	1230,29	1712,75
Sin adición de aditivo	184,54	467,29	824,22	1247,57	1731,07

TRATAMIENTOS	CONSUMO DE MATERIA SECA SEMANAL ACUMULADA (g)			
	8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>
50 mg de <i>L. acidophilus</i> por Kg de concentrado	2309,41	2922,95	3601,34	4236,40
50 mg de <i>B. subtilis</i> por Kg de concentrado	2250,57	2837,91	3484,08	4100,21
Sin adición de aditivo	2276,14	2881,53	3546,35	4183,42

En el gráfico 1 se puede observar la similitud del consumo de materia seca por cuyes con probiótico en comparación con el testigo.



**Gráfico 1: Consumo de alimento de materia seca de cuyes bajo la administración de probióticos a base de *L. acidophilus* y *B. subtilis* en la ración alimenticia, durante 11 semanas. IASA, Ecuador, 2008.**

Jadamus y Simon (2001), reportaron que la inclusión de *B. toyoi* en dietas para pollos broilers permitió reducir el consumo de alimento, debido a que en el experimento con pollos que tuvo una duración de 44 días la adición de probiótico presentó un consumo de 4544 g, mientras que el testigo consumió 4595 g.

Al cotejar esta información con los resultados obtenidos en este estudio se confirmó que la inclusión de *B. subtilis* redujo el consumo de pienso en cuyes, ya que al cabo de 77 días este tratamiento mostró un consumo de 4100.21 g, mientras que el testigo consumió 4183.42 g, Baidya *et al.* (1994) y López (1998), demostraron que el empleo de probióticos en pollos de engorde a base de *B. toyoi* no tuvo efecto sobre el consumo de alimento, ya que para pollos con probiótico se obtuvo un consumo de 4856 g y para el tratamiento testigo el consumo fue de 4816 g durante los 49 días de experimentación.

Rodríguez (2004), menciona que en pollos de engorde existe una diferencia para el consumo de alimento al adicionar *L. acidophilus* y compararlo con el testigo, debido a que en el experimento que duró tres semanas el testigo consumió 811 g/ave, mientras que el tratamiento con probiótico consumió 746 g/ave. Los resultados encontrados en la investigación de cuyes son diferentes, porque al adicionar *L. acidophilus* se obtuvo un mayor consumo de alimento 55.02 g/animal/día, mientras que el testigo consumió 54.33 g/animal/día. La investigación en cuyes tratados con probiótico a base de *L. acidophilus* presentó un mayor consumo de alimento a diferencia del experimento en pollos, puesto que al adicionar *L. acidophilus* se obtuvo una reducción en el consumo de alimento.

En experimento con gazapos de ocho semanas de edad se generó diferencias para el consumo de alimento, ya que el tratamiento testigo consumió 85.7 g/animal/día y el

tratamiento con probiótico a base de *L. acidophilus* consumió 84.3 g/animal/día existiendo una reducción para el consumo de alimento. Estos resultados son diferentes a los obtenidos en cuyes tratados con probiótico a base de *L. acidophilus*, ya que estos consumieron 55.02 g/animal/día, mientras que el testigo consumió 54.33 g/animal/día, presentando un mayor consumo para el tratamiento que incluyó probiótico Rodríguez (2004).

Los resultados de consumo de alimento fueron elevados para el tratamiento con *L. acidophilus*, mientras que el tratamiento con *B. subtilis* tuvo un bajo consumo de alimento, lo cual se ajusta a la información generada por Dani *et al.* (2002), quienes afirman que la adición de *Lactobacillus* como probiótico no es tan eficiente para la reducción de afecciones intestinales.

#### **4.2.2. Ganancia de peso**

Al establecer el análisis de variancia para la ganancia de peso semanal acumulada por cuyes tratados con probióticos, se determinó que no existieron diferencias significativas para los tratamientos, así como para la comparación entre tratamientos durante las 11 evaluaciones realizadas.



**Cuadro 4.2.2.1. Análisis de variancia para la ganancia de peso en cuyes de engorde bajo la suministración de probióticos a base de *L. acidophilus* y *B. subtilis* durante 11 semanas. IASA, Ecuador, 2008.**

FUENTES DE VARIACION	G.L	GANANCIA DE PESO SEMANAL ACUMULADA (g)				
		3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>
<b>TOTAL</b>	11					
<b>TRAT</b>	2	905,01 ns	1211,69 ns	429,15 ns	1422,06 ns	868,32 ns
<b>T<sub>3</sub> VS T<sub>1</sub> T<sub>2</sub></b>	1	1737,06 ns	1881,69 ns	836,03 ns	2125,15 ns	1736,55 ns
<b>T<sub>2</sub> VS T<sub>1</sub></b>	1	72,96 ns	541,70 ns	22,28 ns	718,96 ns	0,08 ns
<b>ERROR</b>	9	830,86	644,20	1430,42	1927,03	2750,60
$\bar{X}$ (g)		35,76	96,88	169,10	232,57	316,39
<b>C.V (%)</b>		80,59	26,20	22,37	18,88	16,58

FUENTES DE VARIACION	G.L	GANANCIA DE PESO SEMANAL ACUMULADA (g)			
		8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>
<b>TOTAL</b>	11				
<b>TRAT</b>	2	875,46 ns	1350,67 ns	3402,92 ns	4189,07 ns
<b>T<sub>3</sub> VS T<sub>1</sub> T<sub>2</sub></b>	1	261,16 ns	162,71 ns	1337,88 ns	4513,61 ns
<b>T<sub>2</sub> VS T<sub>1</sub></b>	1	1489,76 ns	2538,64 ns	5467,97 ns	3864,52 ns
<b>ERROR</b>	9	2982,26	2757,60	2898,61	2355,49
$\bar{X}$ (g)		418,48	504,58	587,22	655,98
<b>C.V (%)</b>		13,05	10,41	9,17	7,40

Los promedios de la ganancia de peso fueron de 35.76 g inicialmente, pero posteriormente fueron aumentando progresivamente cada semana llegando a una ganancia de peso de 655.98 g en la onceava semana. Los coeficientes de variación estuvieron en un rango de 80.59 a 7.40%, los mismos que van decreciendo a medida que avanzan las evaluaciones (Cuadro 4.2.2.1.).

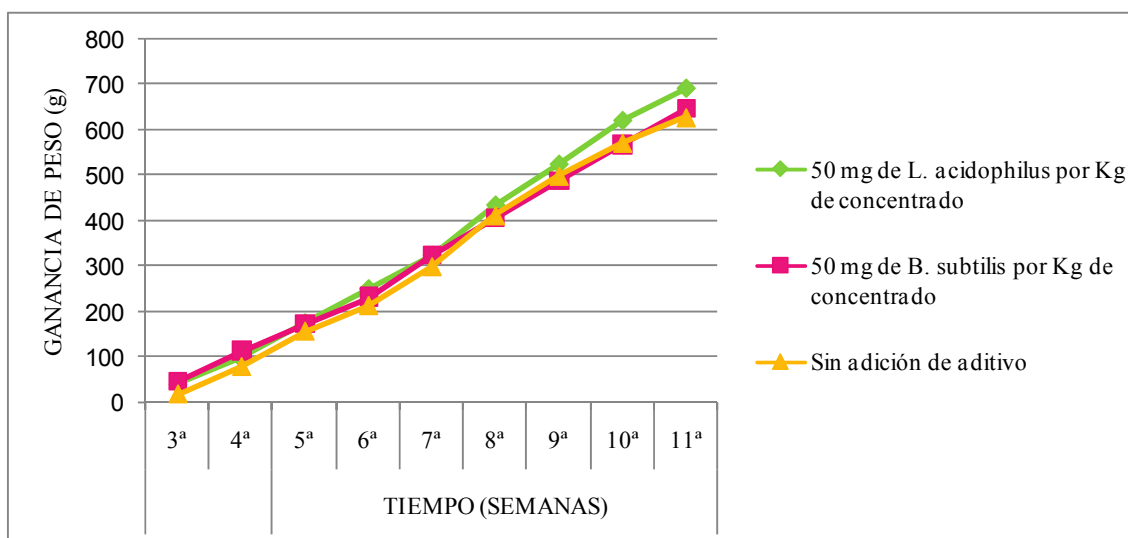
Al analizar los efectos de los tratamientos sobre la ganancia de peso semanal acumulada se determinó que pese a que no existe diferencia significativa para y entre los tratamientos, el tratamiento con *B. subtilis* presentó en las dos primeras evaluaciones las ganancias de peso más elevadas, mientras que la adición de *L. acidophilus* presentó a partir de la quinta semana las ganancias de peso mas elevadas.

**Cuadro 4.2.2 Efecto de la administración de probióticos a base de *L. acidophilus* y *B. subtilis* sobre la ganancia de peso en cuyes de engorde durante 11 semanas.**

TRATAMIENTOS	GANANCIA DE PESO SEMANAL ACUMULADA (g)				
	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>
50 mg de <i>L. acidophilus</i> por Kg de concentrado	41,25	97,50	176,67	251,46	325,00
50 mg de <i>B. subtilis</i> por Kg de concentrado	47,29	113,96	173,33	232,50	324,80
Sin adición de aditivo	18,75	79,17	157,29	213,75	299,38

TRATAMIENTOS	GANANCIA DE PESO SEMANAL ACUMULADA (g)			
	8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>
50 mg de <i>L. acidophilus</i> por Kg de concentrado	435,42	525,00	620,83	691,67
50 mg de <i>B. subtilis</i> por Kg de concentrado	408,13	489,37	568,55	647,71
Sin adición de aditivo	411,88	499,38	572,29	628,55

En el gráfico 2 se puede apreciar que existe similitud entre la ganancia de peso para los tratamientos, pero la mayor ganancia la obtuvo el tratamiento con *Lactobacillus acidophilus*.



**Gráfico 2: Ganancia de peso de los cuyes bajo la administración de probióticos a base de *L. acidophilus* y *B. subtilis* en la ración alimenticia durante 11 semanas.**

En pollos de engorde de 49 días tratados con probióticos a base de *B. toyoi*, estos ganaron 64 g más que los pollos que no recibieron probiótico (Wolke *et al.* 1996).

Los resultados obtenidos en esta investigación de cuyes fueron parecidos a los resultados encontrados en pollos, puesto que el tratamiento con *B. subtilis* ganó 19.49 g más de peso con respecto al testigo.

Colichón *et al.* (1991), demostraron que cuando se suministró una concentración de  $2 \times 10^6$  ufc/ml de *Lactobacillus* en el agua de bebida a pollos desde el primer día de vida en los individuos tratados se encontró desde el día 8 del tratamiento una tendencia a elevar su peso promedio en 4,56 % por encima del grupo control. Los resultados generados en la investigación realizada en cuyes son semejantes a los encontrados en pollos, puesto que el tratamiento con *L. acidophilus* a partir de la quinta semana registró los mayores datos en ganancia de peso promedio, superando en 9.12 % el peso de los animales del testigo.

La ganancia de peso de cuyes tratados con *L. acidophilus* fue de 691.67 g, mientras que el testigo ganó 628.55 g durante los 77 días de investigación, estos resultados son parecidos a los reportados por Ramírez *et al.* (2005), quienes registraron la ganancia de peso para pollitas bajo el tratamiento de probiótico a base de *Lactobacillus* ssp y un tratamiento control sin inclusión de probiótico. La ganancia de peso para pollitas con probiótico fue de 450 g, mientras que el tratamiento control ganó 415.93 g durante los 42 días de investigación. Las diferencias de la ganancia de peso evidencian el efecto probiótico de *Lactobacillus* y a su vez la potencialidad de emplear esta bacteria para generar un producto comercial para la crianza de cuyes.

Los resultados obtenidos para la ganancia de peso en cuyes con *L. acidophilus* fue 691.67 g, mientras que el tratamiento testigo ganó 628.55 g durante los 77 días de investigación. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos para pollos de tres semanas de edad, puesto que al incorporar *L. acidophilus* en el alimento se obtuvo una ganancia de peso de 475 g, mientras que el testigo ganó 484 g (Rodríguez 2004).

En gazapos de ocho semanas de edad se manifestaron diferencias para la ganancia de peso, puesto que al añadir *L. acidophilus* se obtuvo una ganancia de peso de 58.4 g/animal/día y para el tratamiento testigo mostró una ganancia de 60 g/animal/día.

Esta información no es equivalente a los resultados logrados en cuyes, puesto que los cuyes con probiótico a base de *L. acidophilus* registró mayores ganancias de peso de 9.0 g/animal/día, mientras que el testigo expresó ganancias de 8.2 g/animal/día (Rodríguez 2004).

Las bacterias ácido lácticas como *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* y *L. plantarum* aumentan el sistema inmune de la mucosa. Además, estas cepas son capaces de adherirse a la mucosa intestinal y estimular las células fagocíticas más eficientemente que otras bacterias (Schiffrin *et al.* 1997).

Con esta información se corrobora los resultados en el estudio de cuyes, ya que como ciertas especies de *Lactobacillus* actúan en el sistema inmune, el tratamiento con este género presentó la mayor ganancia de peso.

### 4.2.3. Conversión alimenticia

Al establecer el análisis de variancia para la conversión alimenticia no se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos; con una situación igual en la comparación de los tratamientos.

Los promedios generales aumentaron de 10.84 a 66.31 g y el coeficiente de variación decreció a medida que se avanzaron en las evaluaciones ubicándose en el rango de 106.87 a 26.40% (Cuadro 4.2.3.1).

**Cuadro 4.2.3.1. Análisis de variancia para la conversión alimenticia en cuyes de engorde bajo el suministro de probióticos a base de *L. acidophilus* y *B. subtilis* en pruebas en campo durante 11 semanas. IASA, Ecuador, 2008.**

FUENTES DE VARIACION	G.L	CONVERSIÓN ALIMENTICIA SEMANAL ACUMULADA (g)				
		3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>
TOTAL	11					
TRAT	2	212,54ns	214,87 ns	179,31 ns	336,99 ns	373,59 ns
T <sub>3</sub> VS T <sub>1</sub> T <sub>2</sub>	1	424,79 ns	429,43 ns	356,97 ns	662,87 ns	745,38 ns
T <sub>2</sub> VS T <sub>1</sub>	1	0,29 ns	0,32 ns	1,66 ns	11,12 ns	1,80 ns
ERROR	9	134,05	147,87	154,10	195,76	228,34
$\bar{X}$ (g)		10,84	15,83	21,21	29,11	35,54
C.V (%)		106,87	76,81	58,52	48,07	42,52

FUENTES DE VARIACION	G.L	CONVERSIÓN ALIMENTICIA SEMANAL ACUMULADA (g)			
		8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>
TOTAL	11				
TRAT	2	332,04 ns	333,09 ns	400,47 ns	525,58 ns
T <sub>3</sub> VS T <sub>1</sub> T <sub>2</sub>	1	655,32 ns	654,17 ns	761,74 ns	1025,73 ns
T <sub>2</sub> VS T <sub>1</sub>	1	8,76 ns	12,01 ns	39,21 ns	25,42 ns
ERROR	9	226,03	233,37	231,32	266,17
$\bar{X}$ (g)		41,10	48,17	56,71	66,31
C.V (%)		36,58	31,72	26,82	24,60

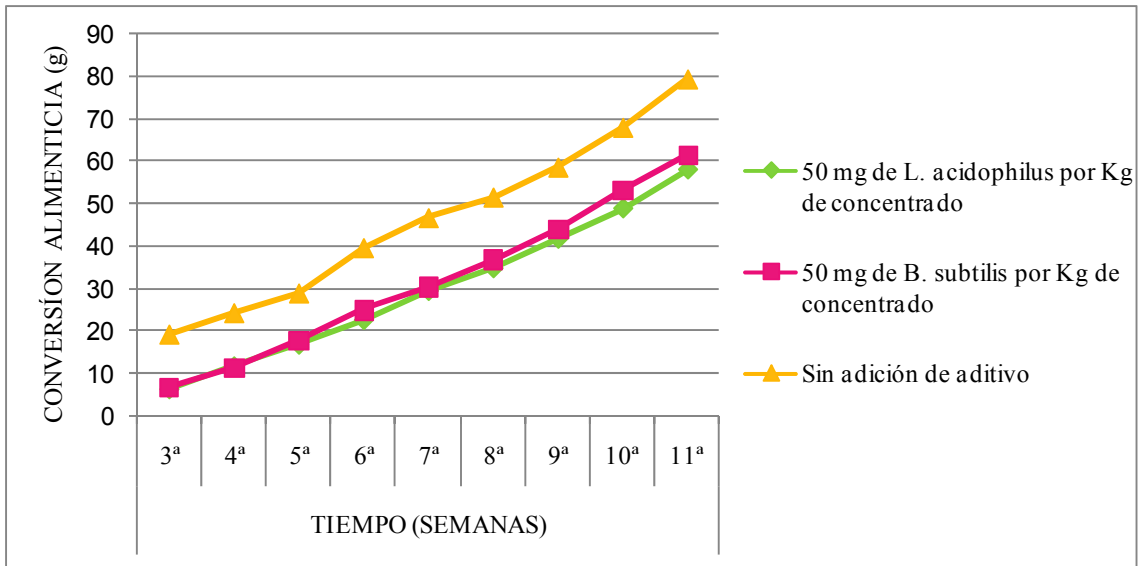
A pesar que los tratamientos no mostraron diferencias significativas se determinó que la mejor conversión alimenticia presentó el tratamiento con *Lactobacillus acidophilus*, seguido del tratamiento con *Bacillus subtilis*, mientras que el testigo presentó una pésima conversión alimenticia.

**Cuadro 4.2.3.2: Efecto de la administración de probióticos a base de *L. acidophilus* y *B. subtilis* sobre la conversión alimenticia en cuyes de engorde durante 11 semanas.**

TRATAMIENTOS	CONVERSIÓN ALIMENTICIA SEMANAL ACUMULADA (g)				
	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>
50 mg de <i>L. acidophilus</i> por Kg de concentrado	6,44	11,80	16,90	22,68	29,49
50 mg de <i>B. subtilis</i> por Kg de concentrado	6,82	11,40	17,81	25,03	30,44
Sin adición de aditivo	19,25	24,29	28,93	39,62	46,69

TRATAMIENTOS	CONVERSIÓN ALIMENTICIA SEMANAL ACUMULADA			
	8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>
50 mg de <i>L. acidophilus</i> por Kg de concentrado	34,83	41,72	48,86	57,99
50 mg de <i>B. subtilis</i> por Kg de concentrado	36,92	44,17	53,29	61,56
Sin adición de aditivo	51,55	58,61	67,98	79,39

En el gráfico 3 se puede observar la diferencia de la mejor conversión alimenticia que corresponde al tratamiento con *L. acidophilus* en comparación con la deficiencia que presentó el tratamiento que no incluyó probiótico.



**Gráfico 3: Conversión alimenticia de cuyes bajo la administración de probióticos a base de *L. acidophilus* y *B. subtilis* en la ración alimenticia durante 11 semanas.**

Ramírez *et al.* (2005), demostraron que al incluir probiótico a base de *Lactobacillus ssp*, la conversión alimenticia mejoró, puesto que se registraron datos de pollitas que al adicionar probiótico en su dieta tuvieron una conversión alimenticia de 2.35, mientras que el tratamiento control tuvo una conversión de 2.68, esta información concuerda con lo registrado en la investigación de cuyes, puesto que la conversión para cobayos tratados con probiótico a base de *L. acidophilus* fue 6.1, para el tratamiento con *B. subtilis* fue 6.3 y para el testigo fue 6.7.

Los resultados de la conversión alimenticia concuerdan con los obtenidos por Tortuero (1973), quien demostró que el suministro de cepas puras de *Lactobacillus acidophilus* en pollos de ceba disminuyó el síndrome de mala absorción y producía una mejora en la conversión alimenticia.

Los *Lactobacillus* contribuyen al incremento de la absorción de nutrientes, debido a que degradan moléculas grandes en otras más pequeñas, de fácil difusión por la pared intestinal; así como por la producción de vitaminas y ácidos grasos de cadena corta, que adicionalmente acidifican el lumen intestinal acelerando las reacciones bioquímicas de la digestión todo lo cual mejora la digestibilidad de los nutrientes (Pérez *et al.* 2002).

La conversión alimenticia para el tratamiento que incluyó *L. acidophilus* y para el tratamiento con *B. subtilis* fueron de 6.1 y 6.3 respectivamente, mientras que para el testigo fue de 6.7. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Rodríguez (2004), quien al adicionar *L. acidophilus* y *S. faecium* a la dieta de pollos de tres semanas registró que la conversión alimenticia para el tratamiento con probióticos fue de 1.57, mientras que para el testigo fue de 1.68.

En gazapos de seis semanas de edad, se demostró que al adicionar *L. casei* al balanceado, la conversión alimenticia fue de 2.03, mientras que para el tratamiento testigo fue 2.07 (Rodríguez 2004).

En cuyes de once semanas de edad al adicionar al balanceado *L. acidophilus* se obtuvo una conversión de 6.1 y para *B. subtilis* la conversión alimenticia fue 6.3, mientras que para el testigo fue de 6.7.

#### **4.2.4. Rendimiento a la canal**

El análisis de variancia para el rendimiento a la canal de cuyes bajo el tratamiento con probióticos, se determinó que no existen diferencias significativas dentro de los tratamientos y entre las comparaciones. El promedio general fue 390.75 g y el coeficiente de variación fue 5.31% (Cuadro 4.2.4.1).



**Cuadro 4.2.4.1. Análisis de variancia para el rendimiento a la canal en cuyes de engorde bajo la suministración de probióticos a base de *L. acidophilus* y *B.subtilis* durante 11 semanas. IASA, Ecuador.**

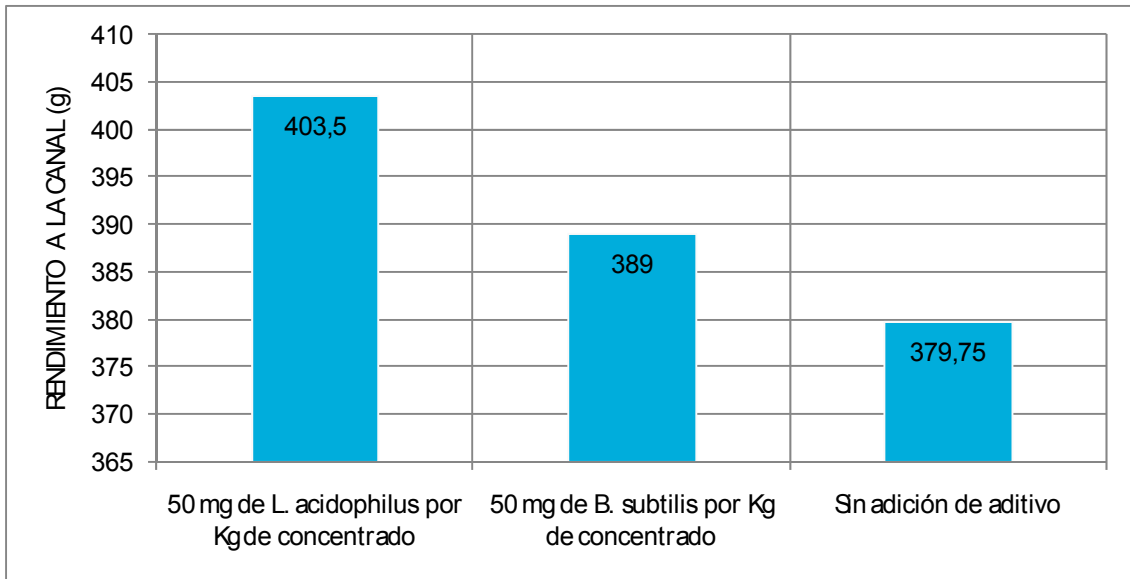
FUENTES VARIACIÓN	G.L	RENDIMIENTO A LA CANAL (g)
TOTAL	11	
TRAT	2	573,25ns
T <sub>3</sub> VS T <sub>1</sub> T <sub>2</sub>	1	726,00ns
T <sub>1</sub> VS T <sub>2</sub>	1	420,50ns
ERROR	9	430,64
$\bar{X}$ (g)		390,75
C.V (%)		5,31

Sin embargo que no existen diferencias significativas entre de los tratamientos, el tratamiento con *Lactobacillus acidophilus* presentó el mejor rendimiento a la canal.

**Cuadro 4.2.4.2. Efecto de la administración de probióticos a base de *L. acidophilus* y *B. subtilis* sobre el rendimiento a la canal en cuyes de engorde durante 11 semanas.**

TRATAMIENTOS	RENDIMIENTO A LA CANAL
50 mg de <i>L. acidophilus</i> por Kg de concentrado	403,50
50 mg de <i>B. subtilis</i> por Kg de concentrado	389,00
Sin adición de aditivo	379,75

En el gráfico 4 se puede observar la diferencia en el rendimiento a la canal por efecto de *Lactobacillus acidophilus* en comparación con el tratamiento testigo que presentó el menor rendimiento a la canal.



**Grafico 4: Rendimiento a la canal de cuyes bajo la administración de probióticos a base de *L. acidophilus* y *B.subtilis* en la ración alimenticia durante 11 semanas.**

En esta variable se demostró que el mayor rendimiento a la canal fue el tratamiento con *L. acidophilus*, puesto que con este tratamiento se consumió más alimento, por tanto presentó una alta ganancia de peso y elevado rendimiento a la canal luego 77 días de tratamiento con probiótico, adicionado al balanceado empleado en la alimentación de cuyes.

#### **4.2.5. Mortalidad**

La variable mortalidad no fue necesario analizarla, puesto que no presentó datos de mortalidad, a excepción de un solo animal que murió a causa de torzón en el tratamiento con testigo.

En pollos de engorde tratados con probióticos a base de *Bacillus toyoi*, no se mostró ningún efecto en la mortalidad de los pollos (Jin *et al.*1998). Esta investigación

concuenda con los resultados en cuyes, debido a que no se registró efecto en la mortalidad, es decir no aumentó ni redujo la mortalidad en relación al testigo.

El uso de probióticos es más eficiente en infantes que en los adultos Senok *et al.* (2005), en el estudio realizado en cuyes el probiótico se suministró a los animales destetados, por lo cual no presentaron mortalidad.

### 4.3. Análisis económico

Siguiendo la metodología del presupuesto parcial, según Perrin *et al.* (1976), se procedió a obtener el beneficio bruto que correspondió al rendimiento a la canal de 12 animales por cada tratamiento. Este peso se multiplicó por el valor del kilo de carne de cuy en el mercado nacional.

Por otro lado se obtuvieron los costos variables para cada uno de los tratamientos, de la diferencia entre el beneficio bruto y los costos variables se obtuvo el beneficio neto (cuadro 4.3.1.).

**Cuadro 4.3.1. Costos variables y beneficios para los tratamientos con la adición de probióticos a base de *L. acidophilus* y *B.subtilis* en la ración alimenticia en cuyes de engorde.**

TRATAMIENTOS	Beneficio Bruto	Costos Variables	Beneficio Neto
50 mg de <i>L. acidophilus</i> por Kg de concentrado	125,89	135,75	-9,86
50 mg de <i>B. subtilis</i> por Kg de concentrado	121,34	118,65	2,69
Sin adición de aditivo	118,48	84,95	33,53

Ordenando los beneficios netos de manera decreciente, acompañados de sus costos variables, se procedió a realizar el análisis de dominancia, donde el tratamiento dominado es aquel que a igual o menor beneficio neto, presentó un mayor costo variable. De este análisis se determinó que el único tratamiento no dominado fue el testigo, por tanto este tratamiento se constituyó en la única alternativa económica, por lo que fue necesario realizar el análisis marginal.

**Cuadro 4.3.2. Costos variables y beneficio neto para los tratamientos con la adición de probióticos a base de *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* en la ración alimenticia en cuyes de engorde.**

TRATAMIENTOS	Beneficio Neto	Costos Variables
Sin adición de aditivo	33,53	84,95
50 mg de <i>B. subtilis</i> por Kg de concentrado	2,69	118,65
50 mg de <i>L. acidophilus</i> por Kg de concentrado	-9,86	135,75

Estadísticamente el tratamiento testigo se constituiría en la única alternativa económica, pero debo resaltar que otros productos como los antibióticos son usados en la producción de cuyes por periodos largos originando un desequilibrio entre las distintas especies presentes en el ciego. Los antibióticos actúan sobre algunas de las bacterias benéficas, consecuentemente se producen fermentaciones indeseables y finalmente la muerte del animal, con los probióticos propuestos en esta investigación se previene el problema enriqueciendo la microflora intestinal con bacterias positivas, o sea a favor de la vida (Palou y Serra 2000).

## V. CONCLUSIONES

Una vez concluidas las pruebas bioquímicas y morfológicas de las bacterias en el IASA como en el CIMICC, se determinó la existencia de 2 cepas de *Bacillus subtilis* y una cepa de *Lactobacillus acidophilus*.

La inclusión de leche descremada en polvo al proceso de liofilización de *L. acidophilus* permitió mantener una excelente viabilidad bacteriana con concentraciones de  $3.65 \cdot 10^8$  a  $4.5 \cdot 10^{11}$  ufc/g probiótico. La fécula de maíz que se adicionó al liofilizar el *B. subtilis* conservó la viabilidad de las bacterias que manifestaron una concentración de  $1.4 \cdot 10^9$  a  $1.8 \cdot 10^{12}$  ufc/g probiótico. La concentración bacteriana se pudo determinar al realizar el control de calidad de los liofilizados

Las bacterias empleadas como probióticos presentaron alta viabilidad al realizar su control de calidad tomando muestras de liofilizados e incluso luego de mezclar las bacterias con melaza.

El suministro de probióticos a base de *B. subtilis*, presentó un menor consumo de alimento, por tanto se constituye en una excelente alternativa económica porque la mayor inversión en una explotación pecuaria corresponde a la alimentación de los animales, sin embargo al adicionar probiótico este gasto se reduciría.

En la variable ganancia de peso los tratamientos no se diferencian estadísticamente, pero el tratamiento con *L. acidophilus*, presentó una mayor ganancia de peso. En términos económicos el uso de probióticos es una buena alternativa, puesto que la

rentabilidad de una explotación pecuaria depende de la ganancia de peso de los animales.

El tratamiento que incluyó *L. acidophilus* superó en 9.12% el peso del tratamiento testigo con una ganancia de peso diaria de 9.0 g, mientras que el tratamiento testigo presentó una ganancia de peso diaria de 8.2 g.

Al realizar el análisis de variancia para la conversión alimenticia los tratamientos no se diferenciaron estadísticamente, pero los cobayos pertenecientes al testigo necesitaron consumir mayor alimento para alcanzar una unidad de peso. La mejor conversión alimenticia la obtuvo el tratamiento con *L. acidophilus*.

La aplicación de probiótico a base de *L. acidophilus*, permitió obtener el mayor rendimiento a la canal, seguido del tratamiento en base a *B. subtilis*, pero no existió diferencias estadísticas con el testigo.

La utilización de los probióticos a base a *L. acidophilus* y *B. subtilis* no manifestó ningún efecto sobre la mortalidad de los animales tratados.

Estadísticamente el tratamiento testigo constituyó la mejor alternativa económica para la crianza de cuyes, pero debo enfatizar que cuando los cuyes sufren alguna enfermedad el productor recurre a antibióticos, el suministro de estos por periodos largos destruyen las bacterias benéficas produciendo alteraciones en la microflora intestinal generando la muerte del animal. Los probióticos previenen el problema colonizando el TGI con bacterias benéficas, por tanto el TGI se mantendrá en equilibrio.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Se recomienda continuar con la investigación realizando una mezcla con las bacterias aisladas y empleando nuevas dosis en cuyes de engorde y reproducción.

Realizar nuevos estudios empleando levaduras u otros microorganismos con características probióticas.

Para mantener las cepas refrigeradas viables, es necesario realizar un refrescamiento con un intervalo de seis meses.

El manejo de las bacterias aisladas debe ser lo mas estéril posible a fin de evitar posibles contaminaciones, alterando los resultados de la investigación.

Es necesario buscar nuevas alternativas para reducir los costos de producción de los probióticos y colocarlos al alcance del productor de cuyes.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acurio D., 2007. Aislamiento, Caracterización y pruebas de eficiencia *in vitro* y bajo invernadero de cepas de *Bacillus subtilis* para control de *Phytophthora infestans* con el fin de establecer un banco de microorganismos. Ecuador. (Tesis).
- Adams MR., 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. J Biotechnol 68: 171–178.
- Alais CH., 1970. Ciencia de la Leche; Principios de técnicas lecheras. Editorial Continental. 1ª edición en español de la 2ª edición francesa. España
- Alais CH., 1984. Ciencia de la Leche. Editorial Continental. 5ta Edición. México DF, México. En la Web:  
  
<http://members.tripod.com/ve/tecnologia/microteo.htm>.
- Alais CH., 1985. Ciencia de la leche y Principios de técnica lechera Ed. Reverte. S.A. pp. 332, 763-764.
- Antoine JM., Adam F., Fazel A., Hartley D., 1994. Bacterias lactiques en alimentation humaine. In: Bacterias Lactiques, Vol II. Lorica. 419-420 pp.
- Barbosa-Cánovas G.V. y Vega Mercado H., 2000. Deshidratación de alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. 297 pp.
- Brambilla G y De Filippis S., (2005) Trends in animal feed composition and the possible consequences on residue tests. Analytica Chimica Acta 529: 7–13.
- Bernardeau M., Guguen M., Vernoux J., 2005. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. Laboratoire de Microbiologie Alimentaire, ISBIO, Université de Caen Basse-Normandie, Caen, France.
- Baidya N., Mandal L., Sarkar SK., Banerjee GC., 1994. Combined feeding of antibiotic and probiotic on the performance of broiler. Indian Poultry Sci; 29:228-231.
- Bibel D., 1988. Bacillus of long life. American Society for Microbiology News, 54:661 – 665.
- Biocrawler. 2006. Bacillus subtilis. En la Web:  
[http://www.biocrawler.com/encyclopedia/Bacillus\\_subtilis](http://www.biocrawler.com/encyclopedia/Bacillus_subtilis).
- Bioland. 2004. Características de Nutri-Compost. En la Web:  
<http://www.bioland.cl/nutricompoust-mo.htm>



- Bourgeois CM y Larpent JP., 1995. Microbiología alimentaria. Editorial Acribia, S.A. Volumen II. Zaragoza – España.
- Caballero A., 1992. Valor nutricional de la panca de maíz: consumo voluntario y digestibilidad en el cuy (*Cavia porcellus*). UNA La Molina, Lima, Perú. (Tesis).
- Casp A y Abril J., 1999. Procesos de conservación de alimentos. Tecnología de alimentos. Editorial AMV Ediciones y Mundi – Prensa. Madrid. 449 pp.
- Clancy R.L., Pang G., Dunkley M., Taylor D. and Cripps, A., 1995. Acute on chronic bronchitis: A model of mucosal immunology. *Immunol. Cell Biol.* 73, 414-417. [8] D'Ostiani, C.F., Del Ser, G. and Bacci, A
- Guarner F and Schaafsma GJ., 1998. Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 39, 237-238
- Caycedo VA., 1992. Investigaciones en cuyes. III Curso latinoamericano de producción de cuyes, Lima, Perú. UNA La Molina, Lima, Perú.
- III Censo Nacional Agropecuario-datos Nacionales Ecuador Inec-mag-sica 2002.
- Cooper G y Schiller A., 1975. *Anatomy of the guinea pig*. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press. 417 págs.
- Chauca FL., Levano SM., Higaonna OR y Saravia DJ., 1992. Efecto del agua de bebida en la producción de cuyes hembras en empadre. XV Reunión científica anual de la Asociación Peruana de Producción Animal (APPA), Pucallpa, Perú.
- Chauca FL., 1993. Experiencias de Perú en la producción de c cuyes (*Cavia porcellus*). IV Symposium de especies animales subutilizadas, Libro de conferencias, UNELLEZ-AVPA, Barinas, Venezuela. 127 págs.
- Colichón A., Columbus I., Roza M., Venegas Evelin., y Prieto A., 1991. Efecto de la administración oral de *Lactobacillus acidophilus* vivos sobre el peso de ponedoras comerciales. Informe preliminar de los 30 primeros días de vida. *Mundo Avícola.* 1 (4): 8 - 10.
- Cheftel J., Cheftel H., y Besancon P., 1992. Introducción a la bioquímica y tecnología de alimento. Volumen II. Editorial Acribia. Zaragoza. 404 pp.
- Dani C., Biadaioli R., Bertini G., Martelli E., Rubaltelli FF., 2002. Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. A prospective double-blind study. *Biol Neonate*; 82: 103-108
- Danone Vitapole. En la Web:

- URL:[http://www.danonevitapole.com/nutri\\_views/searchArchives/index.html](http://www.danonevitapole.com/nutri_views/searchArchives/index.html).
- Dietanet portal médico en nutrición dietética. En la Web:  
URL:<http://www.dietanet.com/htm/gtemas/tema06/tema602.asp>
  - Diplock AT., Aggett PJ., Ashwell M., Bornet F., Fern EB y Roberfroid MB., 1998. Scientific concepts of functional foods in Europe, consensus document. (FF-27-de98) Bruxelles : ILSI Europe, p. 17.
  - Dhingra OD., y Sinclair J. B., 1985. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 355 pp.
  - Dunne CL., O'Mahony L., Murphy G., Thornton D., Morrisen S., O'Halloran M., Feeney S., Flynn G., Fitzgerald C., Daly B., Kiely G., O'Sullivan F., Shanahan and Collins JK., 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Am. J. of Clin. Nutr. 73(Supl.): 386S-392S.
  - Dunne C., Murphy L. and Flynn., 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. Antonie van Leeuwenhoek 76, 279^292.
  - ECK A., 1990. El queso. Ed. Omega, Barcelona, España.
  - Farnworth ER., 2001. Probiotics and prebiotics. En Handbook of Nutraceutical and functional foods [RE Wildman] Ed. CRC Press. Cap. 25: 407 – 422.
  - Florian AA., 2004. Sanidad en cuyes. Instituto Nacional de Extensión e Investigación Agraria – INIE, Lima, Perú.
  - Fuller R., 1989. A review: Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66, 365-378.
  - Fuller R., Houghton S., and Brooker B., 1981. Attachment of *S. faecium* to the duodenal epitellum of the chicken and its importance in colonization of the small intestine. Applied of Environmental Microbiology. 41: 1433 – 1441.
  - Fuller R., 1989. A review: Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66, 365-378.
  - Gibson GR y Roberfroid MB., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. 125, 1401-1412.
  - Gilliland SE., 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev.87: 175 – 188.

- Gómez BC., y Vergara V., 1993. Fundamentos de nutrición y alimentación. I Curso nacional de capacitación en crianzas familiares, págs. 38-50, INIA-EELM-EEBI.
- Gómez C., 2004. "Obtención de Microorganismos Probióticos en un Medio no Láctico", Anexo C, Tesis Universidad de los Andes, Bogotá – Colombia.
- Gorbach SL., 1996a The discovery of Lactobacillus GG. Nutrition Today; 31 (suppl 1):2S-4S.
- Gorbach SL., 1996b Efficacy of Lactobacillus in treatment of acute diarrhea. Nutrition Today; 31 (suppl 1):19S-23S.
- Grossowics N., Kaplan D., and Schneerson S., 1947. Production of an antibiotic substance by a Lactobacillus. International congress of Microbiology 5<sup>th</sup> Congress. Rio de Janeiro, 137 – 138.
- Gotz V., 1979. Prophylaxis against ampicillin associated diarrhea with a lactobacillus preparation. American Journal Hospital Pharmacologic, 36: 754-757.
- Guarner F and Schaafsma GJ., 1998. Probiotics. Int. J. Food Microbiol. 39, 237-238
- Guarner F., 2000. El colon como órgano: habitat de la flora bacteriana Alimentación Nutrición y Salud 7 (4) 99-106.
- Gustafson R., 1991. Symposium: Antibiotic residues in meat and milk. Journal of Dairy Science, 74: 1428 – 1432.
- Hassan AN., y Frank, J F., 2001. Starter cultures and their use. En H.E. Marth y L. Steele; Applied dairy microbiology. Second edition. Revised and expanded. Ed. Marcel Dekker, INC, New York, EEUU.
- Hayashi KJ., Dairy Sci. 73: 579-583., 1990. Nousiainen, J. Brief communications of the XXIII International dairy Congress. Montreal 8, 12: 364 (1990). En la Web:  
<http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/viencuent/caballero.htm>
- Hillman K., 2001. Producción animal: Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales. En la Web:  
[http://produccionbovina.com/informacion\\_técnica/invernada\\_promotores\\_crecimiento/.html](http://produccionbovina.com/informacion_técnica/invernada_promotores_crecimiento/.html)

- Holdeman LC., Good IJ y Moore W.E.C., 1976. Human faecal flora variation in bacterial composition within individual and a possible effect of emotional stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 359 – 375.
- Holzzapfel WH., (2002) Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int J Food Microbiol* 75: 197–212.
- Jadamus A y Simon WV., 2001 Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler and piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 54: 1-17.
- INIA. 1995. Crianza de Cuyes. Reimpresión. Lima, Perú.
- Jin ZL., Ho WY., Abdullah N y Jalludin S., 1998. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poultry Sci*; 77:1 259-1 265.
- K  
Irsop BE y Snel S., 1984. Maintenance of Microorganisms, A manual of Laboratory Methods, p. 33, Academic Press Inc. Ltd. London, UK.
- K  
Onigs WN., Kok J., Kuipers OP y Poolman B., 2000 Lactic acid bacteria: the bug of the new millennium. *Curr Opin Microbiol*3: 276–282.
- Lindgren S., y Dobrogosz W., 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Review*, 87: 149 – 164.
- López CC., 1998. Susceptibilidad al síndrome ascítico de diferentes estirpes genéticas de pollos de engorda (tesis de doctorado). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
- Moncayo R., 2002. Aspectos del consumo de alimento concentrado y forraje en cuyes. Ibarra - Ecuador
- Moreno R.A., 1989. El cuy. 2a ed. Lima, UNA La Molina. 128 págs.
- National Research Council (NRC). 1978. Nutrient requirements of laboratory animals. 33 ed. Washington. D.C., National Academy of Science. 96 págs
- Naidu AS., Bidlack WR and Clemens RA., 1999. Probiotics spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev. In Food Sci and Nutr.* 38:13-126.
- Ninanya A., 1974. Coeficiente de digestibilidad del heno de alfalfa afechillo maíz y harina de pescado en cuyes. UNA La Molina, Lima, Perú. (Tesis.)

- Ordoñez JA., Cambero MI., Fernández L., García GD., de la Hoz L., y Selgas, M.D., 1998. Tecnología de alimentos. Volumen I. Componentes de los alimentos y procesos. Editorial Síntesis, S.A., Madrid. 365 pp.
- O' Sullivan MG., Thornton G., O' Sulliva G.C and Collins JK., 1993. Probiotic bacteria: myth or reality? Trends Food Sci, Technol. 21: 309 – 313. En la Web: [http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592007004000012&lng=es&nrm=iso](http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592007004000012&lng=es&nrm=iso)
- Palou A., y Serra F., 2000. Perspectivas europeas sobre los alimentos funcionales. Alimentación Nutrición y Salud 7 (3) 76-90. En la Web: <http://www.respyn.uanl.mx/iv/2/ensayos/bacteriocinas.htm>
- Parker R., 1974. Probiotics, the other hall of the antibiotics story. Animal Nutrition and Health, 29: 4- 8
- 1. Perdigo'n, G., Maldonado Galdeano, C., 2004. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. Centro de Referencias para Lactobacilos (CERELA), Chacabuco, Tucuma'n, Argentina, and Cátedra de Inmunología
- Prasad JH., Gill J and Gopal P.K., 1998. Selection and characterization of Lactobacillus and Bifidobacterium strains for use as probiotics. Int. Dairy J. 8:993-1002.
- Pérez M., Laurencio M., Piad R E., Milán G y Rondón A., 2002. Evaluación de la actividad probiótica de un producto de exclusión competitiva sobre indicadores microbiológicos en el ciego de pollos de ceba Rev. Cubana de Ciencias Avícolas. 26 (1): 29 – 35.
- Perrín R., Anderson J., Mascardi E., 1998. La formulación de recomendación a partir de datos agronómicos: un manual metodológico de evaluación económica. CIEMMMYT. México, DF.79p
- Ramírez B., Zambrano O., Ramírez Y., y Rodríguez Valera., 2005.Evaluación del efecto probiótico Lactobacillus ssp. Origen aviar en pollitas de inicio reemplazo de la ponedera comercial en los primeros 42 días de edad En la Web: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>
- Robinson RK., 1987. Microbiología Lactológica. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. Vol I. En la Web: <http://members.tripod.com.ve/tecnologia/microteo.htm>

- Rodríguez M., 1994. Bacterias productoras de ácido láctico: Efecto sobre el crecimiento y la flora intestinal de pollos, gazapos y lechones. Madrid. (Tesis doctoral)
- Saavedra JM., Bauman NA., Dung I., Perman JA y Yolken RH., 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 344, 1046-1049
- Saravia J., Gómez C., Ramírez S., y Chauca F.L., 1994. Evaluación de cuatro raciones para cuyes en crecimiento. XVII Reunión científica anual de la Asociación Peruana de Producción Animal (APPA), Lima, Perú. 84 págs.
- SenokC, Ismael1A.and Botta G., 2005. Probiotics: facts and myths. Department of Microbiology, Immunology and Infectious Diseases, College of Medicine and Medical.
- Simon O, Jadamus A y Vahjen W (2001) Probiotic feed additives—effectiveness and expected modes of action. *J Anim Feed Sci* 10: 51–67.
- Suárez E., Álvarez R., 1991. Yogur y leches fermentadas. Aspectos generales. *Alimentación Equipos y Tecnología*. N° 9. Editorial Alicón, S.A. España. 119-126 pp.
- Suskovic J., Brkic B., Maticic S., Maric V., 1997. *Lactobacillus acidophilus* M92 as potential probiotic strain. *Milchwissenschaft*. 52: 430-435. 1997
- Schaafsma G., 1996. Significance of probiotics in human diets. In SOMED 21st International congress on microbial ecology and disease, Paris, October 28-30, 1996. Paris: Institut Pasteur, p. 38.
- Shahani K., and Ayevo A., 1980. Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microecology. *American Journal of Clinical Nutrition*. 33: 2448 – 2457.
- Schleifer J., 1985. A review of the efficacy and mechanism of competitive exclusion for the control of *Salmonella* in poultry. *World Poultry Science Journal*, 41: 72 – 83.
- Schneitz C., Nuotio L., and Lounatma K., 1993. Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S – layer). *Journal of applied Bacteriology*, 74: 290 – 294.
- Schrezenmeir J and Vrese M., 2001. Probiotics, prebiotics, and symbiotic—approaching a definition. *Am J Clin Nut* 73 (suppl) 361-364.

- Schiffrin EJ., Brassart D., Servin AL., Rochat F and Donnet- Hughes A., 1997. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *American Journal of Clinical Nutrition* 66, 515S–520S
- Sneath P., Mair N., Sharpe E., y Holt J., 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology –Volumen 2*. Williams and Wilkins Company Co. Baltimore Maryland, 969 – 1599 pp.
- Stanbury P. F., Whitaker A., y Hall S. J., 1995. *Principles of Fermentation Technology*. Elsevier/Pergamon publications. BPC Wheatons Ltd. Exete. 357 pp.
- Tamine A. Y., y Robinson R. K., 1991. *Yogurt: ciencia y tecnología*. Editorial Acribia. Zaragoza. 368 pp.
- Tannock G.W., Fuller R., Smith S.A., & Hall, M.A. 1990. Plasmid profiling of members of the family enterobacteriaceae, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1225-1228.
- Ten Brink B., Minekus M., Bol J., and Huis in T' Veld J., 1987. Production of antibacterial compounds by Lactobacilli. *Microbiology Reviews*, 46: 64.
- Teixeira SBM Caro., Chauca RP., Do Vale H., Abreu LR y Riveiro AC., 2003. Elaboración de una bebida láctea a partir del suero Ricota. *Alimentaria* 2003; 349:97-101. En la Web:  
[http://sociedades.sld.cu/nutricion/RevistaCubanaAlimentacionNutricion/Vol\\_17\\_2/Art1\\_103\\_108.pdf](http://sociedades.sld.cu/nutricion/RevistaCubanaAlimentacionNutricion/Vol_17_2/Art1_103_108.pdf)
- Tortuero F., 1973. Influence of the implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. *Poultry Sci*;52:197-203.
- Thomke S y Elwinger K., 1998. Growth promotants in feeding pigs and poultry III. Alternatives to antibiotic growth promotants. *Annals of Zootechnology* 47: 245–271.
- Wagner JE., y Manning PJ., 1976. *The biology of the guinea pig* págs. 79-98. Londres, Academic Press.

- Wolke LF., Fleming JS y Mira RT., 1996. Utilic o do probiótico *Bacillus natto* como promotor de crescimento na alimentac o de frangos de corte. Agr Curitiba 1; 15:103-107.
- Yeo J y Kim KI., 1997. Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic or Yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. Poult Sci 76: 381–385.
- Zaldívar AM., y Vargas N., 1969. Estudio de tres niveles de azúcar como fuente de energía más un concentrado comercial en cobayos. EELM, Lima, Perú. 7 págs.
- Zaldívar AM y Chauca F.L., 1975. Crianza de cuyes. Ministerio de Agricultura, Lima, Perú, Boletín Técnico N  81.
- Zaldívar AM., 1976. Crianza de cuyes y generalidades. I Curso nacional de cuyes, Universidad Nacional del Centro, Huancayo, Perú. 23 págs.
- Zimmerman D., 1986. Role of subtherapeutic levels of antimicrobials in pig production. J Anim Sci 62: 6–17.
- Zimmermann B., Bauer E y Mosenthin R., 2001 Pro- and prebiotics in pig nutrition–potential modulators of gut health? J Anim Feed Sci 10: 47–56.



## VIII. ANEXOS

### Anexo 1. Resultados de la pruebas de caracterización IASA y CIMICC

COD AISLADOS	COLOR	BORDE	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS				PRUEBAS BIOQUÍMICAS															
			CR. PCA+PB		CR. A + AA		GRAM	FORMA	ESPORAS	KOH 3%	YODOGRAM	CATALASA	OXIDASA	M1			M2			M3		
			PIG	CREC	PIG	CREC								A	AN	A	AN	A	AN	A	AN	
M1Y 2:10	Crema	Rugoso	Amarillo	Bueno	No	Bueno	L	Bastón	No	-	□	□	Tardía	□	□	□	-	-	-	-	-	
M1 1:5	Crema	Rugoso	Amarillo	Bueno	No	Bueno	B/L	Bastón	Si	-	□	-	Tardía	-	-	-	-	-	□	-		
M2	Crema	Rugoso	Amarillo	Bueno	No	Bueno	B/L	Bastón	Si	-	□	□	Tardía	□	□	□	□	-	-			
M3S1 Br	Crema	Rugoso	Amarillo	Bueno	No	Bueno	B/L	Bastón	Si	-	□	□	Tardía	±	±	-	-	-	-			
M3S1	Crema	Rugoso	Amarillo	Bueno	No	Bueno	B/L	Bastón	Si	-	□	-	Tardía	□	±	□	□	-	-			
M4S2	Crema	Liso	Amarillo	Bueno	No	Bueno	Lactococo	Redonda	Si	-	□	□	Tardía									

COD AISLADOS	PRUEBAS BIOQUÍMICAS								Ziel Neelsen
	24 horas				48 horas				
	Manitol	Arabinosa	TSI	H S	Manitol	Arabinosa	TSI	H S	
M1Y 2:10	-	-	AFD	-	-	-	B	-	-
M1 1:5	-	-	A	-	□	-	A	-	-
M2	-	-	AFD	-	-	-	B	-	-
M3S1 Br	d	-	B	-	□	-	B	-	-
M3S1	-	-	AFD	-	-	-	C	-	-
M4S2	□	±	A	-	□	-	B	-	-

### LEYENDA

COD = Código

A = Aerobio

PB = Púrpura de Bromocresol

PIG = Pigmento

CREC = Crecimiento

PCA= Plate Count Agar

AA= Acido Ascórbico

M1= medio para la producción de ácido

M2= medio para la producción de gas

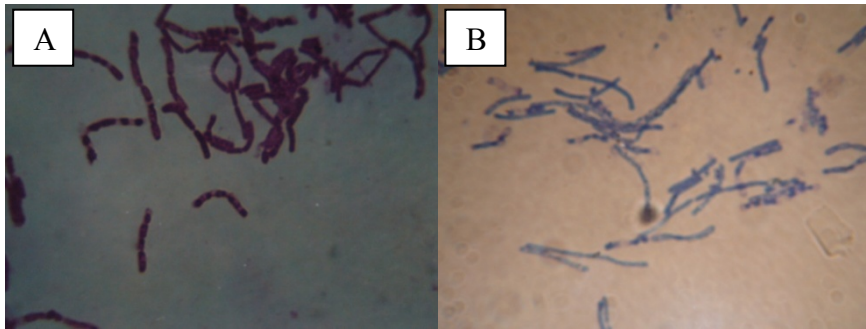
M3= medio para la producción de acetoina

AN = Anaerobio

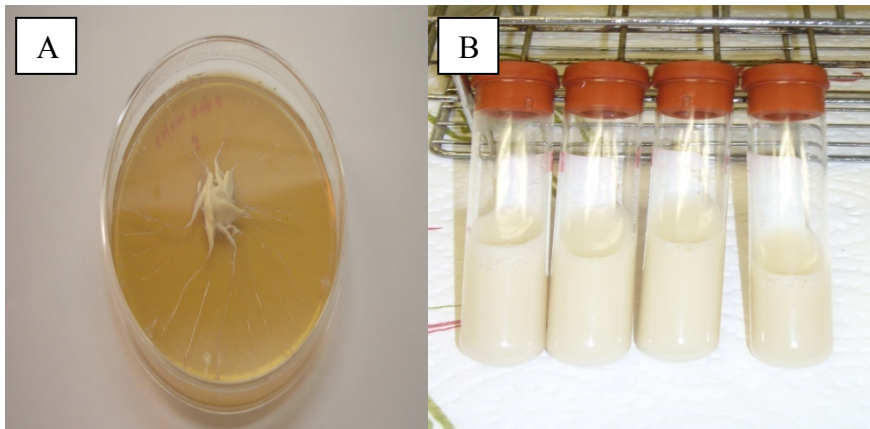
FD= fermentación Dextrosa

d= dudoso

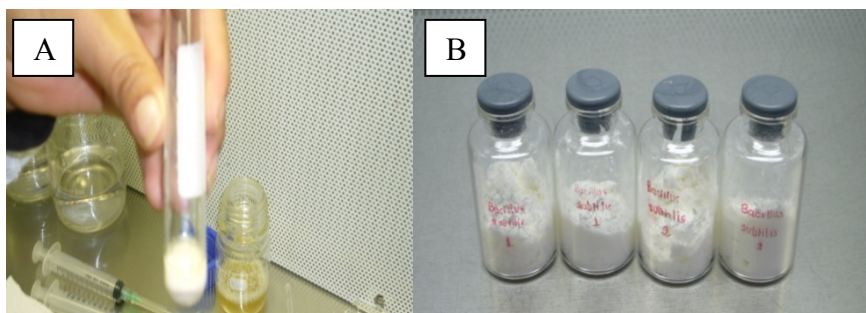
**Anexo 2. Fotos de la fase de laboratorio**



**Bacteria eliminada después de la tinción gram (A) Bacteria seleccionadas para caracterizar (B)**

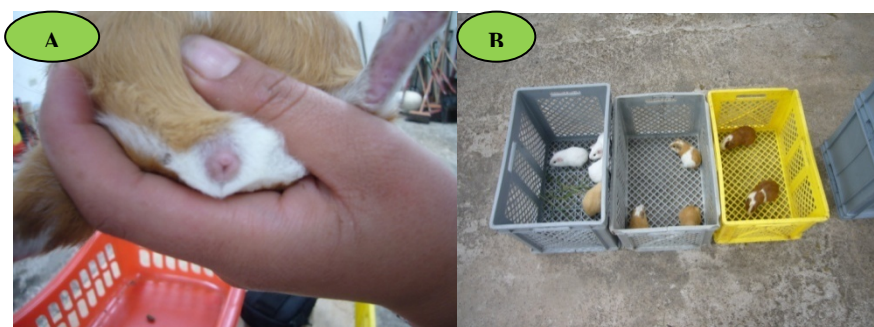


**Preparación de biomasa bacteriana para liofilizar (A) Concentración de biomasa para liofilizar (B)**

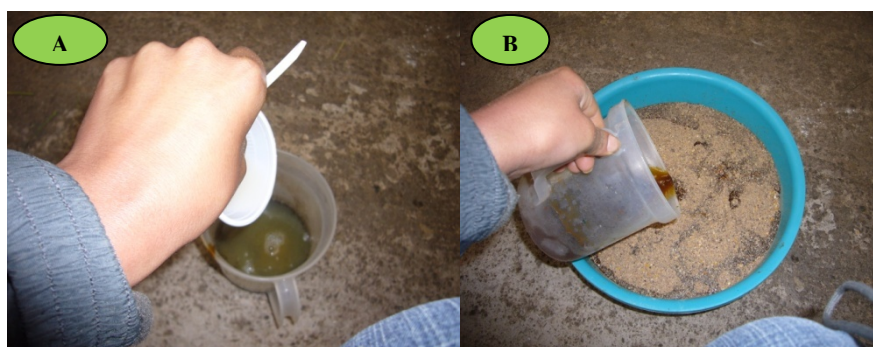


**Precipitado bacteriano luego de centrifugar (A) Bacterias liofilizadas (B)**

### Anexo 3. Fotos de la fase campo



**Clasificación de animales por sexo (A) Separación de animales por peso (B)**



**Preparación de la melaza con el probiótico (A) Mezcla de melaza con probiótico y balanceado (B)**



**Desangre de cuyes (A) Rendimiento a la canal (B)**