

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



“Evaluación del potencial probiótico *in vitro* de bacterias ácido lácticas aisladas de heces de cuy (*Cavia porcellus*) de un Centro experimental de crianza intensiva al oeste de Lima, Perú”

Tesis para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Carla Patricia Serrano Fung

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

LIMA - PERÚ

2020

Dedicado a mi familia, especialmente a mis padres y hermana, que sin ellos no sería la
persona que soy ahora.

A mis amigos, por estar ahí para escucharme hablar sobre de cuyes a cada minuto

Y a mi Papita, que sé que debes de estar gruñendo en el cielo.

AGRADECIMIENTOS

- A mi asesor, Dr. Luis M. Jara, por apoyarme en toda la trayectoria de esta tesis. Su paciencia al enseñar y gusto por la investigación hicieron que descubriera en mí las ganas de querer seguir la rama de microbiología aplicada a la veterinaria.
- A la Ing. Lilia Chauca y a toda la familia del Programa de Cuyes en INIA, por brindarme todo su apoyo y darme dos de los mejores meses de rotación que tuve.
- A mi familia, amigos y Gordo, por ser una influencia positiva en mi vida y motivar a superarme cada día.

ABSTRACT

The guinea pig (*Cavia porcellus*) is a herbivorous, monogastric rodent mammal, of short reproductive cycle and native to the Andean region of South America, whose meat production is currently considered as a livestock activity with the possibility of generating large utilities. Probiotics can be used in production as a complementary tool to the diet to improve feed conversion, weight gain and overall improvement of animal health. The present study evaluated the *in vitro* probiotic capacity of one hundred and fifty lactic acid bacteria (LAB) isolated from feces of three breeds of guinea pigs from an experimental intensive breeding center located west of Lima, using agar tests that evaluated the capacity of amylolytic, proteolytic and cellulolytic enzymatic activity of strains and their production of compounds with antagonistic effect against *Salmonella spp.* The strains that achieved some positive result to any of the assays described above, their survival capacity was evaluated at pH 2.0, 4.0 and 0.3% bile. The isolates were entirely Gram positive, 93.3% of bacillary morphology and 6.7% ovoid morphology; and negative catalase 89.3%. With respect to the agar tests, of the isolated strains, 38.7% demonstrated the ability to degrade an agar based on soluble starch substrate (amylolytic agar), 66.7% on one with milk based substrate (proteolytic agar) and 4% for agar based on sodium carboxymethylcellulose (CMCA-Na). Only 5.3% of strains had antagonistic action against *Salmonella spp.* The frequency of strains according to race in relation to amylolytic and proteolytic degradation proved to have significant statistical association. The survival capacity of the strains evaluated by each race is also highlighted, where a frequency greater than 40% was obtained in each trial.

Keywords: *Cavia porcellus*, Probiotics, Lactic acid bacteria, Guinea pigs.

RESUMEN

El cuy (*Cavia porcellus*) es un mamífero roedor herbívoro, monogástrico, de ciclo reproductivo corto y nativo de la región andina de Sudamérica, cuya producción de carne es considerada en la actualidad como una actividad pecuaria con posibilidad de generar grandes utilidades. Los probióticos pueden utilizarse en la producción como una herramienta complementaria a la dieta para mejorar la conversión alimenticia, aumento de peso y mejora general de la salud de los animales. El presente estudio evaluó la capacidad probiótica *in vitro* de ciento cincuenta bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de heces de tres razas de cuyes provenientes de un Centro experimental de crianza intensiva ubicado al oeste de Lima, mediante ensayos en agar que evaluaron la capacidad de actividad enzimática amilolítica, proteolítica y celulolítica de las cepas y su producción de compuestos con efecto antagónico frente a *Salmonella spp.* De las cepas que lograron algún resultado positivo a alguno de los ensayos descritos anteriormente, se evaluó su capacidad de supervivencia a pH 2.0, 4.0 y bilis al 0.3%. Los aislados fueron en su totalidad Gram positivas, un 93.3% de morfología bacilar y un 6.7% morfología ovoide; y catalasa negativo un 89.3%. Con respecto a los ensayos en agar, de las cepas aisladas, un 38.7% demostró capacidad de degradar un agar con sustrato a base de almidón soluble (agar amilolítico), un 66.7% a uno con sustrato a base de leche (agar proteolítico) y un 4% para agar a base de carboximetilcelulosa sódica (CMCA-Na). Solo el 5.3% de cepas tuvo acción antagónica frente a *Salmonella spp.* La frecuencia de cepas según raza en relación a la degradación amilolítica y proteolítica demostró tener asociación estadística significativa. Se resalta además la capacidad de supervivencia de las cepas evaluadas por cada raza, donde se obtuvo en cada ensayo una frecuencia mayor al 40%.

Palabras clave: *Cavia porcellus*, Probióticos, Bacterias ácido lácticas, cuyes

INTRODUCCIÓN

El cuy (*Cavia porcellus*) es una especie nativa de la región andina de Sudamérica, su distribución abarca mayoritariamente los países de Ecuador, Colombia, Perú y Bolivia. Ha sido ancestralmente utilizado como una fuente de carne magra alta en proteína o como sujeto en tradiciones folklóricas hechas hasta la actualidad (Morales, 2013; Avilés *et al.*, 2014). Es un mamífero roedor herbívoro, monogástrico y de ciclo reproductivo corto (Chauca, 1997).

Para el año 2017, la Encuesta Nacional Agraria reportó una población de 17 millones 380 mil cuyes en el país. Su potencial en el mercado internacional está en alza, se observa en los últimos 10 años un crecimiento anual en exportaciones de 18.4%, de esta manera posicionando al Perú como el país con mayor exportación de esta carne. Siendo su principal comprador Estados Unidos (99.9%) y en menor proporción Japón, Canadá, Corea del Sur, Italia y Aruba (Ministerio de Agricultura y Riego, 2019).

Los niveles de producción en el país se clasifican dependiendo de su contexto en la unidad productiva. Éstos se denominan como sistema de producción familiar, familiar comercial (semi-intensivo) y comercial (intensivo). La crianza familiar tiene una mayor difusión en las regiones andinas, y su desarrollo se basa mayoritariamente en el uso de insumos y mano de obra que puedan encontrarse en el hogar. La crianza familiar-comercial o semi-intensiva se le caracteriza por tener más organización y mayor aplicación de conceptos tecnológicos; y finalmente la crianza comercial o intensiva, la cual tiene una menor difusión, caracterizada por el uso de alta tecnología, líneas de raza mejoradas e instalaciones separadas para reproductores y cría. (Morales, 2017; Avilés *et al.*, 2014). Por otro lado, a nivel nutricional los cuyes tienen requerimientos tales como proteínas, fibra, energía, minerales, vitaminas, entre otros. Se sugiere que en la etapa de crecimiento los animales tengan dietas con fibra (10%) que en su mayoría se encuentra en el forraje, proteínas (13-17%), minerales y energía digestible (2800 kcal/kg) que pueden ser encontrados en el concentrado (Chauca, 1997).

La intensificación de la producción ha conllevado a una mayor incidencia de enfermedades, que se ven en su mayoría directamente relacionadas con la densidad de animales; esto resulta en pérdidas económicas a corto y largo plazo en la producción de diferentes escalas (Chuquizuta y Morales, 2017). Dentro de los agentes etiológicos los bacterianos más conocidos que afectan el sistema digestivo de los cuyes son *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, *Escherichia coli*, entre otros (Chuquizuta y Morales, 2017; Caballero, 2015).

La salmonelosis en cuyes en el Perú es considerada como la enfermedad de mayor importancia por su alta morbilidad (52.7 %) y mortalidad (95%). *Salmonella* es una bacteria bacilo corto Gram negativa, no esporulada, oxidasa negativa, anaerobia facultativa y con capacidad de motilidad gracias a sus flagelos peritricos (Morales, 2017). Es capaz de afectar a todos los estados productivos y tener una presentación tanto aguda como crónica, afectando al sistema digestivo, nervioso o reproductivo. Además, posee un carácter enzoótico y potencialmente zoonótico (Morales, 2013). Se reconocen principalmente a los serovares *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, y *S. Dublin* de *Salmonella enterica* como los causantes de enfermedad en cuyes, siendo *S. Typhimurium* la mayormente aislada en el Perú (Morales, 2017).

En la búsqueda de opciones para el control sanitario se han implementado alternativas como la administración de forma preventiva de dosis bajas de antibióticos como promotores de crecimiento. Actualmente, se busca erradicar esta alternativa por los problemas de rechazo comercial de la carne con residuos y el impacto en la salud pública que la resistencia a antibióticos pueda generar a los consumidores, además de la falla terapéutica que podría darse en los sistemas de producción (Guevara *et al.*, 2016).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) define a los probióticos como todo aquel microorganismo vivo que al ser administrado en cantidades adecuadas confiere un beneficio a la salud integral del huésped (FAO/WHO, 2002), como por ejemplo previniendo la presentación de enfermedades entéricas (Bernardeau *et al.*,

2006). Éstos pueden ser clasificados según su origen bacteriano o no bacteriano (levaduras y hongos), formadores de esporas, multi- o única especie hospedera, y/o alóctonos (microorganismos generalmente no encontrados en la microbiota intestinal, ej. levaduras) o autóctonos (microorganismos encontrados normalmente en la microbiota intestinal, ej. *Lactobacillus*) (FAO, 2016). Para el desarrollo de los probióticos se estipulan pautas y pruebas que debe pasar cada microorganismo de forma *in vitro* para que sea considerado posteriormente como benéfico. Algunas de ellas incluyen la sobrevivencia a microambientes o ensayos que asemejen las condiciones del tracto gastrointestinal, resistencia a sales biliares, capacidad de adherencia a mucosa y antagónica frente a patógenos (FAO/WHO, 2002).

Como parte de planeamiento nutricional utilizado en gran variedad de especies de producción cárnica, se ve al uso de probióticos como una herramienta para mejorar la conversión alimenticia, aumento de peso y mejora general de la salud (Moreira *et al.*, 2016). Estos tienen mecanismos como el mejoramiento de la barrera epitelial entérica, reforzando su integridad y posiblemente promoviendo la secreción de moco; colonización en la mucosa entérica, previniendo la adhesión y excluyendo bacterias patógenas. Se describen además mecanismos como la generación de un microambiente hostil o depleción de nutrientes esenciales para los patógenos; producción de sustancias antimicrobianas como bacteriocinas; y finalmente un efecto inmunomodulador, estas bacterias tienen la habilidad de poder interactuar con células epiteliales, dendríticas, monocitos, macrófagos y linfocitos del sistema inmune (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un diverso grupo de bacterias Gram-positivas, anaerobias facultativas, no móviles y catalasa negativa. Morfológicamente son cocos o bacilos de longitud variable y tienen un amplio uso como probióticos (Parra, 2010). Entre sus características más representativas se destacan especies capaces de modular genes encargados de codificar proteínas relacionadas en la adhesión de la unión entre célula-célula, incrementar la expresión de mucina o modificar su expresión para evitar la adhesión de cepas patógenas como *Salmonella spp.* Algunas cepas del género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Mitsuokella* tienen la capacidad de inhibir directamente el crecimiento de patógenos Gram positivos, negativos y levaduras por medio de mecanismos tales como producción

de ácido láctico, peróxido de hidrógeno, competitividad por nutrientes o secreción de bacteriocinas (Wagner, Johnson and Kurniasih, 2009; Levine, Bearson and Stanton, 2012; Coman *et al.*, 2014; Di Cerbo *et al.*, 2016). Este tipo de bacterias solo crecen en medios selectivos, entre los que se destaca Man, Rogosa and Sharpe (MRS), utilizado para la enumeración de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas (Fox *et al.*, 2000).

Estudios previos donde fue utilizado un consorcio de bacterias aisladas del tracto gastrointestinal de cuyes (*Enterococcus hirae*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *Streptococcus thoraltensis* y *Bacillus pumilus*, tuvieron como resultado un efecto positivo en la conversión alimenticia, más no en el rendimiento de carcasa o ganancia de peso (Torres *et al.*, 2013). No obstante, existe otro estudio similar donde utilizando una mezcla probiótica con *Lactobacillus-Bifidobacterium- Saccharomyces* en la dieta de cuyes, tuvo resultados positivos en ganancia de peso e índice de conversión alimenticia (Cano *et al.*, 2016).

Existen otras pocas investigaciones sobre la evaluación de cepas autóctonas y alóctonas del tracto gastrointestinal de cuyes; tanto *in vitro* como *in vivo*, y los cambios que éstas pueda producir en los parámetros productivos, sanguíneos o en la morfología intestinal (Gonzales, 2018; Cano, 2016). Sin embargo, se requieren realizar más estudios con cepas autóctonas de sistemas tecnificados para ser evaluadas *in vitro* para su potencial capacidad probiótica. En ese contexto, el presente estudio evaluó el potencial de cepas BAL aisladas de heces de cuyes de las razas Perú, Andina e Inti en ensayos *in vitro* para la capacidad de degradar almidón, proteína y celulosa, así como la capacidad antagonica frente a *Salmonella spp.*, y sobrevivencia a condiciones gastrointestinales.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Tipo y lugar de estudio

El estudio fue de naturaleza observacional descriptiva. La recolección de muestras fue realizada durante el mes de Junio del 2019, en el galpón N° 1 (Cuyes reproductores de razas Perú, Andina e Inti) dentro de las instalaciones del INIA (Instituto Nacional de Innovación Agraria), Lima. El procesamiento de las muestras fue realizado en el Laboratorio de Nutrición Animal e Inocuidad Alimentaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

2. Criterios de inclusión y exclusión

2.1. Criterios de inclusión

- Pozas en las que se encontraron cuyes reproductores, preferiblemente con crías lactantes.
- Pozas donde se observaron que todos los animales estén clínicamente sanos, sin registro de enfermedad o signos con 2 semanas previas al muestreo.

2.2. Criterios de exclusión

- Pozas en las que los cuyes fueron tratados con antibióticos al menos 2 semanas previas al muestreo.

3. Tamaño y recolección de muestras

Las heces recolectadas fueron obtenidas del Galpón N°1 (Reproductores con/sin gazapos) del INIA. El tamaño de muestra fue considerado de acuerdo al Teorema Central del Límite (Alvarado y Batanero, 2008), en donde el tamaño mínimo de unidades (pozas) muestreadas fue de 30, de las cuales correspondieron a 10 por cada raza de cuy.

Se recolectó un aproximado de 10 gramos de heces presuntamente frescas (húmedas) en frascos estériles, de diferentes partes de cada poza. Para el transporte de las muestras se utilizó un contenedor cooler acondicionado con paquetes de gel refrigerante a una temperatura de aproximadamente 4°C para su traslado hasta el laboratorio. Finalmente, cabe resaltar que el procesamiento de las muestras se realizó como máximo dentro de las primeras 4 horas desde la recolección.

4. Procesamiento de muestras y evaluaciones

4.1. Homogeneización de heces

Las muestras de heces fueron homogeneizadas con 50 ml de suero fisiológico (NaCl 0.9%) estéril y uniformizadas con un mazo de mortero previamente desinfectado.

4.2. Aislamiento e identificación microbiológica presuntiva

Cien (100) µL de la muestra de heces homogeneizada fue colocada en 5 ml de caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS; Difco, Francia) e incubado durante 24 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia, el cual fue logrado colocando una vela encendida dentro de una cámara de anaerobiosis antes de sellarla para la incubación. Luego, se sembró por agotamiento sobre agar MRS para ser incubado bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Posteriormente 5 colonias fueron seleccionadas para un segundo aislamiento. El criterio de selección de estas colonias fue al azar entre las que tuvieron un crecimiento individual más apartado entre sí (Cueto y Aragón, 2012), considerando colonias tanto transparentes como blanquecinas cremosas. La evaluación microbiológica de las colonias aisladas de cada poza fue realizada con tinción Gram y prueba de catalasa (Anexo 1).

4.3. Pruebas de potencial probiótico *in vitro*

4.3.1. Evaluación de capacidad potencialmente antagónica frente a *Salmonella spp.*

La actividad antagónica frente a *Salmonella spp.* fue realizada con el método modificado de difusión por cilindros sobre agar Müeller Hinton (MH). Además, previo al ensayo, también fue medido el crecimiento overnight de cada una de las cepas mediante un espectrofotómetro con registro de densidad

óptica (Anexo 1). Para todos los ensayos descritos en esta investigación, solo fueron evaluadas las cepas BAL que lograron una densidad óptica (DO) mayor a 0.1, el cual debía lograrse en crecimiento de 24 hrs. a 37°C en condiciones de microaerofilia en caldo MRS.

Sobre un agar MH se sembró en tres direcciones una suspensión a escala Mc Farland 0.5 (espectrofotometría a 625 nm) de un aislado clínico de *Salmonella spp.* de cuyes (perteneciente al cepario del Laboratorio de Nutrición Animal e Inocuidad Alimentaria). Seguidamente se realizaron pocillos sobre el agar que fueron cortados con una punta de micropipeta de 100 µL, y llenados con 70 µL de sobrenadante del cultivo líquido de cada BAL, centrifugados previamente a 2500 rpm por 5 minutos. Finalmente, el agar fue puesto a reposar a 4°C por 10 minutos y luego se incubó a 28°C por 24 hrs. en condiciones aerobias. La lectura de la actividad antagónica del sobrenadante fue realizada mediante la medición del diámetro en milímetros del halo de inhibición formado alrededor de los pocillos (Hassanzadazar *et al.*, 2012).

4.3.2. Evaluación de la capacidad de actividad enzimática

4.3.2.1. Actividad proteolítica

Se realizó utilizando un agar a base de leche parcialmente descremada en polvo (Nestlé® Carnation®, EEUU) al 1.5% con agar Tripticasa de Soya (TSA; HIMEDIA, India), donde se colocó 2 µL de caldo MRS de cada cepa BAL aislada previamente, e incubada a 37°C por 24 hrs. en condiciones de microaerofilia. La lectura de la capacidad de actividad enzimática fue realizada por observación de un halo transparente de degradación alrededor de las colonias en el agar (Asaduzzaman *et al.*, 2018). Asimismo, cada diámetro de halo fue medido con una regla para su registro. Cabe resaltar que, para la validación de esta técnica, una cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 19659™ fue utilizada como control positivo debido a su conocida capacidad en la industria alimentaria como productor de proteasas.

4.3.2.2. Actividad amilolítica

Se realizó utilizando un agar a base de almidón soluble (HiMedia, India) al 1% con agar TSA, el cual fue validado con la misma cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 19659TM. Se colocaron 2 µL de caldo MRS de cada cepa BAL incubada a 37°C por 24 horas en condiciones de microaerofilia. La capacidad de actividad enzimática fue evaluada colocando lugol de Gram (Diagtest, Perú) directamente sobre la placa, revelando un halo de degradación/consumo del almidón del agar (Asaduzzaman *et al.*, 2018). A su vez, cada diámetro de halo fue medido con una regla para su registro. Para esta prueba fue considerado también como resultado positivo aquellas cepas donde se apareció un halo circunscrito por debajo de la colonia, el cual fue observado realizando un raspado con asa de siembra en el área de crecimiento.

4.3.2.3. Actividad celulolítica

Se realizó utilizando un agar a base de Carboximetilcelulosa sódica (CMC-Na; Sigma Aldrich, EEUU), la cepa utilizada para la validación de este ensayo fue *Streptomyces spp.* ATCC 25507TM conocido por su capacidad de producir enzimas con acción sobre celulosa (Hu, Liu & Yang, 2012). Se colocaron 2 µL de caldo MRS de cada cepa BAL incubada bajo las mismas condiciones que los ensayos anteriores. La capacidad de actividad celulolítica fue evaluada colocando lugol de Gram (Diagtest, Perú) sobre la placa durante 5 minutos, revelando un halo de degradación o consumo de celulosa del agar (Asaduzzaman *et al.*, 2018; Kasana *et al.*, 2008). Cada diámetro de halo fue medido en milímetros y registrado.

4.3.3. Pruebas de supervivencia a condiciones gastrointestinales

Para evaluar la capacidad de supervivencia *in vitro* de cada cepa BAL a algunas condiciones que simulen el tracto gastrointestinal de cuy, se evaluaron sólo las cepas que lograron tener un resultado positivo a alguno de los ensayos descritos anteriormente.

4.3.3.1. Diferentes grados de pH

Las cepas BAL seleccionadas fueron colocadas en tubos con caldo MRS e incubadas por 24 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia. Luego fueron llevadas a escala Mc Farland 0.5 en suero fisiológico estéril (NaCl 0.9%), obteniendo una suspensión bacteriana aproximada de 1.5×10^8 UFC/ml. Luego, a cada cepa se le realizó diluciones seriadas en microtubos hasta llegar a 10^4 UFC/ml en suero estéril con pH ajustado a 2.0 y 4.0 mediante adición de HCl. De esta última dilución se extrajeron 0.1 ml y se colocaron en pocillos de microplacas de fondo plano, los cuales fueron dejadas a incubar por 3 horas a 37°C en microaerofilia. Al término del tiempo de incubación, el contenido de cada pocillo fue sembrado por la técnica de disseminación en placas MRS individuales, para luego incubarlas por 48 hrs. a 37°C en condiciones de microaerofilia. Posteriormente, se realizó el conteo de colonias y el porcentaje de supervivencia fue determinado con la ecuación:

$$\% = (\text{Log UFC N1})/(\text{Log UFC N0}) \times 100$$

Donde N1 fue el total de bacterias viables luego del ensayo, y N0 el número inicial de bacterias inoculadas (Cueto-Vigil et al., 2010).

4.3.3.2. Sales biliares

La bilis utilizada para este ensayo fue colectada de la vesícula biliar de cuyes beneficiados para comercialización dentro de las instalaciones del INIA. Ésta fue filtrada con un disco con filtro de membrana de 0.45 µm descartable (Puradisc™, Whatman™) en un ambiente estéril, para ser luego almacenada a -20°C hasta su posterior uso. Similar al ensayo anterior, las cepas aisladas en caldo MRS con crecimiento de 24 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia fueron llevadas a escala Mc Farland 0.5 en suero fisiológico estéril pH 7.0 con bilis al 0.3% (Hassanzadazar *et al.*, 2012), y luego diluidas hasta llegar a una concentración de 10^4 UFC/ml. De esta última dilución se extrajeron 0.1 ml y fueron puestos en pocillos de microplacas de fondo plano, para ser dejados a incubar por 3 horas a 37°C en microaerofilia. Posteriormente, el contenido de cada pocillo fue sembrado por disseminación en placas

MRS individuales, y llevado a cultivo por 48 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia. El recuento de cepas viables fue hallado de similar forma que en el ensayo 4.3.3.1.

5. Análisis de resultados

Los resultados se colocaron en tablas de frecuencia para estadística descriptiva. Para evaluar la asociación estadística entre la frecuencia de aislados BAL según la raza y la capacidad amilolítica, proteolítica fue utilizada la prueba de Chi-cuadrado con el programa WinEpi (Universidad de Zaragoza, España). Mientras que para la capacidad de degradación celulolítica y de antagonismo a *Salmonella spp.* se utilizó la prueba exacta de Fisher con el programa STATA (Ver. 14.0). Ambas pruebas fueron realizadas con un nivel de significancia de 0.05.

6. Consideraciones éticas

El presente estudio no manipuló animales, y fue aprobado por el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia bajo el número de inscripción 104186 y Constancia 043-06-19.

RESULTADOS

De las 30 pozas muestreadas, 10 correspondieron a la raza Perú, 10 a la raza Andina y 10 a la raza Inti, de las cuales fueron aisladas 5 cepas por cada poza. Se aislaron un total de 150 cepas que demostraron ser en su totalidad Gram positivas. Un 93.3% de morfología bacilar, 6.7% morfología ovoide y catalasa negativo un 89.3%.

Del total de cepas aisladas un 38.7% demostró tener capacidad de degradar almidón soluble (agar amilolítico), un 66.1% a sustrato a base de leche (agar proteolítico) y un 4% a agar a base de carboximetilcelulosa (agar celulolítico). Para el ensayo *in vitro* frente a *Salmonella spp.*, un 5.3% de cepas tuvo actividad antagónica (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia de cepas según raza de cuy y actividad probiótica *in vitro* (n=150).

Prueba probiótica <i>in vitro</i>	Razas			Total (%)
	Perú (%)	Andina (%)	Inti (%)	
Amilolítico	18,0	16,0	4,7	38,7
Proteolítico	32,7	16,7	16,7	66,1
Celulolítico	0,0	0,7	3,3	4,0
Antagonismo	1,3	4,0	0,0	5,3

Se observó que de la raza Perú se tuvo mayor cantidad de cepas para degradación amilolítica y proteolítica, mientras que de la raza Inti para actividad celulolítica; y finalmente de la raza Andina para antagonismo. En los Anexos 1 y 2 respectivamente, se detallan los resultados de cada cepa y un ejemplo de resultado positivo de cada ensayo en agar.

Se encontró asociación estadística significativa entre las frecuencias de aislados según raza (Perú, Andina e Inti) y degradación amilolítica ($p < 0.0001$) y proteolítica ($p < 0.0001$), por medio de la prueba Chi-cuadrado (Anexo 3, Tablas 2 y 3).

En lo correspondiente a los ensayos de degradación celulolítica y antagonismo, por medio de la prueba exacta de Fisher, no se encontró asociación estadística significativa entre las frecuencias de aislados según raza y los ensayos en mención (Anexo 3, Tablas 4 y 5).

En cuanto a la capacidad de sobrevivencia a diferentes condiciones gastrointestinales, en la Tabla 6 se muestra la frecuencia de cepas que lograron sobrevivir a cada ensayo según la raza, considerando sólo aquellas que previamente resultaron tener alguna capacidad de degradación enzimática o antagónica (50 cepas para Perú, 40 para Andina y 29 para Inti). Se determinó como positivo a las cepas que sobrevivieron, es decir las que obtuvieron algún porcentaje mayor a 0.00% de supervivencia en los ensayos. En los tres ensayos se denota que la raza Perú e Inti cuentan con la mayor frecuencia de cepas capaces de sobrevivir a alguno de los ensayos.

Tabla 6. Frecuencia de cepas con capacidad de sobrevivencia a diferentes condiciones gastrointestinales *in vitro*

Razas	Ensayos					
	pH 2,0		pH 4,0		Bilis 0.3%	
	Número de cepas sobrevivientes	Frecuencia (%)	Número de cepas sobrevivientes	Frecuencia (%)	Número de cepas sobrevivientes	Frecuencia (%)
Perú	38	76,00	43	86,00	38	76,00
Andina	20	50,00	22	55,00	30	75,00
Inti	13	44,83	28	96,55	26	89,66

En las Tablas 7, 8 y 9 se han clasificado sólo a las cepas sobrevivientes a diferentes condiciones gastrointestinales como menor o mayor al 5% de supervivencia. La frecuencia de supervivencia $\geq 5\%$ en cada uno de los ensayos se vio evidenciada en las cepas de la raza Andina.

Tabla 7. Frecuencia de cepas mayores al 5% de supervivencia al ensayo de pH 2.0

Razas	Supervivencia a pH 2.0	
	Frecuencia 0.05-4,99%	Frecuencia $\geq 5\%$
Perú	92,11	7,89
Andina	80,00	20,00
Inti	92,31	7,69

Tabla 8. Frecuencia de cepas mayores al 5% de supervivencia al ensayo de pH 4.0

Razas	Supervivencia a pH 4.0	
	Frecuencia 0.05-4,99%	Frecuencia $\geq 5\%$
Perú	86,05	13,95
Andina	77,27	22,73
Inti	82,14	17,86

Tabla 9. Frecuencia de cepas mayores al 5% de supervivencia a ensayo de bilis 0.3%

Razas	Supervivencia a bilis	
	Frecuencia 0.05-4,99%	Frecuencia $\geq 5\%$
Perú	97,37	2,63
Andina	53,33	46,67
Inti	57,69	42,31

DISCUSIÓN

Sornplang y Piyadeatsoontorn (2016) clasifican a las fuentes de cepas potencialmente probióticas como convencionales y no convencionales. En la primera se mencionan a los productos lácteos (productos animales, subproductos o leche materna humana) y las heces; y en la segunda a productos fermentados, fuentes no derivadas del intestino, entre otros. Aunque todas estas opciones son fuentes de cepas con capacidad probiótica, se describen a las que son encontradas en el intestino o heces como potencialmente mejores para el uso como probiótico, ya que suelen tener mejor capacidad de adhesión a la mucosa intestinal, y supervivencia a condiciones gastrointestinales.

En los resultados del presente estudio se observó una mayor frecuencia de cepas BAL de la raza Perú que tuvieron capacidad proteolítica y amilolítica de forma *in vitro*. Esto podría tomarse en consideración para futuros estudios *in vivo*, ya que esta raza es considerada la más precoz y con mayor facilidad de ganancia de peso. Tal como lo sugiere Cano *et al.* (2016), en donde fue observado que la inclusión de una suspensión de *Lactobacillus-Bifidobacterium-Saccharomyces* en la dieta de cuyes, generaba una mejora en la ganancia de peso e índice de conversión alimenticia en la etapa de crecimiento y acabado.

Existen BAL capaces de hidrolizar almidón como el *Streptococcus bovis* y *Pediococcus darnnosfis*, aunque su actividad amilolítica ha sido reportada como inferior a la de las levaduras (reconocidas por su morfología ovoide o esférica), hongos o bacterias de la familia *Bacillaceae* (García, 2012). La importancia de la evaluación de la actividad amilolítica de una cepa potencialmente probiótica radica en que su inclusión puede ayudar a mejorar la digestión de carbohidratos previa a la llegada al ciego, lo cual sería importante durante la etapa de lactación, en donde la digestión de carbohidratos se ve limitada por la capacidad del páncreas aún en desarrollo (García, 2012).

Sobre las proteínas, es bien sabido su importancia en la dieta para la formación de músculos, consideradas como constituyentes esenciales y de mayor cantidad en los tejidos musculares. En caso de deficiencia se observan disminución de producción de leche, problemas reproductivos, pérdida de peso

y bajo peso al nacimiento (Velis, 2017). Bernaola (2018) menciona el uso de aditivos tales como probióticos y/o enzimas exógenas, con la finalidad de complementar la dieta y mejorar la digestibilidad y absorción de nutrientes en animales. Entre éstos podría destacarse a las BAL, también utilizados en la industria de productos lácteos como *S. thermophilus*, *L. helveticus*, y *L. bulgaricus*. Los cuales son capaces de formar sistemas de proteólisis para una adecuada fermentación de la leche; y también levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* capaces de liberar proteasas exógenas (Chavez-López *et al.*, 2011).

Mientras que la raza Andina fue la que tuvo mayor número de aislados con capacidad celulolítica. Como se sabe, el forraje en la dieta de cuyes aporta fibra que ayuda a retrasar los movimientos peristálticos del intestino, y con ello facilitar a que el alimento ingerido se quede más tiempo y los nutrientes puedan ser absorbidos de mejor manera (Velis, 2017; Condori, 2014). Uno de los componentes de la fibra vegetal es la celulosa, la cual, puede ser aprovechada por medio de la fermentación microbiana en el ciego del cuy. Aunque un exceso puede conllevar al cese completo de ingesta de alimento, y además generar distensión del tracto gastrointestinal (Condori, 2014). La existencia de microorganismos capaces de degradar la celulosa como *B. pumillus*, *Bacteroides succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens*, podrían prevenir esta situación adversa (Meryandini *et al.*, 2011; Varel *et al.*, 1984). Otro punto importante es que además podría evaluarse la administración de cepas celulolíticas en la dieta de cuyes jóvenes, cuyo sistema digestivo podría verse afectado al cambio de dieta de lactante a una de producción (García, 2012).

Otro aporte del forraje en la dieta es la de la vitamina C (ácido ascórbico). Debido a que los cuyes no poseen la enzima hepática L-gulonolactona oxidasa, el ácido ascórbico no puede sintetizarse, por lo tanto, su única fuente debe ser exógena (Suckow, Stevens and Wilson, 2012) o también mediante el uso de cepas con capacidad de sintetizarlo como *L. parafarraginis* y algunas cepas de *L. pentosus* (Montaño *et al.*, 2013).

Con respecto al potencial antagónico, fue utilizada la técnica de difusión en agar por pocillos para evaluar *in vitro* la capacidad de las cepas para inhibir el crecimiento de *Salmonella spp.* Esta actividad *in vitro* puede ser potencialmente demostrada por otros métodos como siembra radial, cruzada modificada o co-cultivo líquido descritos en Coman *et al.* (2014), aunque los resultados variables reportados en cada prueba son evidentes. Esto da a entender la importancia de la utilización conjunta de varios ensayos junto con réplicas biológicas y técnicas para tener información más exacta sobre el antagonismo potencial que puede poseer una cepa. Asimismo, cabe resaltar que se ha reportado que el efecto antagónico en algunas cepas se veía potenciado cuando se hacía uso de colonias de bacterias, y no solo del sobrenadante sin células (Coman *et al.*, 2014). Por tanto, es posible que utilizando más de un tipo de ensayo pueda haberse evidenciado más de un 5.3% de cepas capaces de antagonizar la *Salmonella spp.* en el presente estudio. Sin embargo, se destaca a la raza Andina con la mayor frecuencia de aislados con capacidad antagónica.

Aunque el potencial de producir mayor diámetro de halo (degradación u antagonismo) podría ser directamente proporcional al número de bacterias en suspensión, esto no necesariamente se cumple ya que en el presente estudio se evidenció que suspensiones de BAL con baja DO de crecimiento lograron tener mayor halo de degradación o inhibición que otras con mayor DO. Dando a entender que la capacidad de degradación o antagonismo puede no solo depender de la capacidad de crecimiento de la bacteria, sino también del propio compuesto que esta pueda producir. Como ha descrito Bermudez-Brito *et al.*, (2012), los diferentes mecanismos que algunas bacterias ácido lácticas tienen para antagonizar patógenos incluyen el producir compuestos orgánicos como el ácido láctico o acético, o bacteriocinas dependientes de algunas determinadas especies como la lactacina B del *L. acidophilus*, plantaricina de *L. plantarum*, bifidocin B de *B. bifidum*, entre otros. Siendo importante la identificación de las especies de cepas BAL del presente estudio que hayan tenido capacidad antagónica o de sus compuestos y su evaluación en campo para la potencial reducción de los casos de salmonelosis en cuyes.

Los ensayos de supervivencia fueron realizados con las cepas que lograron tener al menos un resultado positivo a cualquiera de los ensayos de degradación o antagonismo. Para éstos fue elegido un tiempo de

incubación de 3 horas en condiciones de microaerofilia en base al tiempo de vaciado gástrico en cuyes de aproximadamente 2 – 3 horas (Suckow, Stevens and Wilson, 2012). Asimismo, los pH evaluados en este estudio son semejantes a los reportados en Merchant *et al.* (2011) donde se menciona que el pH en la región fúndica es de 4.4; y de la región antral 2.8, en cuyes de laboratorio alimentados de manera *ad libitum*. Debido a que se evaluó la supervivencia de cepas potencialmente probióticas, los pH fueron ajustados a 2.0 y 4.0 para ensayar condiciones de mayor hostilidad, y por ende ser más estricta la evaluación. Aún con este ajuste, los resultados a los dos ensayos demostraron que en todas las razas hubo una frecuencia mayor a 40% de cepas sobrevivientes. La capacidad de supervivencia de cepas potencialmente probióticas ha sido reportada en otros estudios, entre ellos se menciona al género *Lactobacillus* donde se puede destacar la especie *L. rhamnosus* con capacidad de sobrevivir a condiciones de pH 2.5 por 4 hrs. (Corcoran *et al.*, 2005).

Con respecto a la supervivencia a sales biliares, este ensayo contribuye a la evaluación de otras condiciones de estrés bacteriano en el intestino delgado; en la literatura se menciona al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* como poseedores de mecanismos de protección a daños oxidativos, y algunas especies con capacidad de hidrolizar sales biliares como *L. amylovorus*, *L. plantarum*, *B. animalis*, *B. longum* entre otras (Ruiz, Margolles y Sánchez, 2013). Si bien las evaluaciones *in vitro* simulan las condiciones gastrointestinales, no garantizan la supervivencia *in vivo*. Por lo que es necesario evaluar otras condiciones estresantes como la adición de proteasas, además de la identificación de las especies de BAL encontradas en el presente estudio que presentaron una supervivencia mayor al 5%.

Este estudio presentó algunas limitantes, entre ellas fue que no se evaluó la capacidad de adhesión por parte de las cepas a mucosa intestinal. Esto sería importante para determinar el potencial de colonización y de ello también evaluar indirectamente la competitividad con otras cepas. Asimismo, tampoco fue evaluada la capacidad de las cepas para degradar lípidos (componente de la dieta de cuyes), así como la identificación parcial de los posibles compuestos antagónicos frente a *Salmonella spp.* Por otro lado, es importante además evaluar la seguridad *in vitro* de las cepas mediante perfiles de resistencia antibiótica y la capacidad hemolítica.

Es necesario resaltar la importancia del presente estudio desarrollado de manera *in vitro*, ya que da una perspectiva preliminar del potencial probiótico de cada cepa evaluada. No todas las cepas evaluadas resultaron tener a la vez una capacidad enzimática para todos los compuestos y antagónica frente a *Salmonella spp.* Sin embargo, su identificación a nivel de especie permitiría su eventual utilización como un consorcio de microorganismos que puedan potenciar sus propiedades benéficas en el hospedero receptor. La información sobre la capacidad que las cepas ácido lácticas autóctonas de cuyes puedan tener de forma *in vitro* son la base para futuras investigaciones de pruebas *in vivo* y su aplicación que contribuya a generar un significativo beneficio en la salud o mejora de los parámetros productivos y sanitarios en cuyes.

CONCLUSIONES

- Las heces de cuy representan una fuente de BAL con potencial probiótico *in vitro*.
- Al menos una BAL aislada de las heces de cuy tuvo la capacidad de degradar en conjunto compuestos de proteínas, almidones y celulosa.
- La raza Perú obtuvo una mayor frecuencia de cepas BAL con actividad amilolítica y proteolítica (18% y 32%, respectivamente) mientras que la raza Inti tuvo la mayor frecuencia en degradación celulolítica (3.3%).
- La raza Andina tuvo una mayor frecuencia de cepas BAL con capacidad antagónica frente a *Salmonella spp.* patógena (4%).
- La frecuencia de cepas aisladas según la raza de cuy estuvo asociada significativamente a la capacidad de degradar almidón y proteína en agar.

RECOMENDACIONES

- Son necesarios más estudios para determinar la sobrevivencia de las cepas en tracto gastrointestinal como la adición de proteasas, así como la identificación de los compuestos antagónicos frente a patógenos, capacidad de adhesión a la mucosa intestinal, competitividad de colonización con otras cepas, entre otras.
- Para tener una mayor exactitud en la información de la capacidad de una cepa potencialmente probiótica sobre algún ensayo, es necesario realizar un mínimo de 3 réplicas técnicas.
- Debe considerarse muestras no sólo a partir de heces, sino también de diferentes segmentos del intestino delgado y grueso de los cuyes, para aumentar la probabilidad de hallar mayor cantidad de cepas con potencial probiótico.

LITERATURA CITADA

1. Alvarado, H. y Batanero, C. (2008). Significado del Teorema central del límite en textos universitarios de probabilidad y estadística. *Estudios Pedagógicos*. 2, 7-28. doi: 10.4067/S0718-07052008000200001.
2. Asaduzzaman, M., Iehata, S., Akter, S., Kader, M., Ghosh, S., Khan, M. & Abol-Munafi, A. (2018). Effects of host gut-derived probiotic bacteria on gut morphology, microbiota composition and volatile short chain fatty acids production of Malaysian Mahseer *Tor tambroides*. *Aquaculture Reports*. 9, 53-61. doi: 10.1016/j.aqrep.2017.12.003
3. Avilés, D., Martínez, A., Landi, V. y Delgado, J. (2014). El cuy (*Cavia porcellus*): un recurso andino de interés agroalimentario. *Animal Genetic Resources*. 55 (1), 87–91. doi: 10.1017/S2078633614000368.
4. Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C. & Gil, A. (2012). Probiotic Mechanisms of Action. *Annals of Nutrition & Metabolism*. 61(1), 160-174. doi: 10.1159/000342079.
5. Bernardeau, M., Guguen, M., & Vernoux, J. P. (2006). Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(4), 487–513. doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00020.x.
6. Bernaola, C. (2019). *Suplementación con un complejo enzimático en dietas balanceadas de crecimiento en cuyes mejorados (Cavia porcellus)* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina.
7. Caballero, R., (2015). Caracterización fenotípica y genotípica de salmonelosis en *Cavia porcellus* (cuyes) en las Regiones de Cajamarca, Lima y Moquegua. (Tesis de Pregrado). Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.
8. Cano, J., Carcelén, F., Ara, M., Quevedo, W., Alvarado, A. y Jiménez, R. (2016). Efecto de la Suplementación con una Mezcla Probiótica sobre el Comportamiento Productivo de Cuyes (*Cavia porcellus*) durante la Fase de Crecimiento y Acabado. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 27(1), 51-58. doi: 10.15381/rivep.v27i1.11458.

9. Chauca, L. (1997). Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
10. Chaves-López, C., Paparella, A., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2011). Proteolytic activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with Italian dry-fermented sausages in a model system. *International Journal Of Food Microbiology*, 150(1), 50-58. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.017
11. Chuquizuta, C. y Morales, S., (2017). Identificación de agentes bacterianos aislados de gazapos muertos de cuyes en una granja de crianza intensiva en Lima, Perú. *Revista Electronica de Veterinaria*. 18 (12), 13. Recuperado de: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121217/121738.pdf>
12. Coman, M., Verdenelli, M., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Boyko, N. & Cresci, A. (2014). *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502 and SYN BIO against pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. 117 (1), 518-527. doi: 10.1111/jam.12544
13. Condori, R. (2014). Evaluación de bajos niveles de fibra en dietas de inicio y crecimiento de cuyes (*Cavia porcellus*) con exclusión de forraje. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
14. Corcoran, B., Stanton, C., Fitzgerald, G., Ross, R. (2005). Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (1). 3060-3067. doi:10.1128/AEM.71.6.3060–3067.2005.
15. Cueto, C., y Aragón, S. (2012). Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria to reduce *in vitro* cholesterol. *Scientia Agropecuaria*, 45-50. doi: 10.17268/sci.agropecu.2012.01.06
16. Cueto-Vigil, M., Acuña-Monsalve, Y., Valenzuela-Riaño, J., (2010). Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. *Scientific Electronic Library Online*, 32(93), 129-138. Obtenido de: <http://www.scielo.org.co/pdf/acbi/v32n93/v32n93a1.pdf>

17. Di Cerbo, A., Palmieri, B., Aponte, M., Morales, J & Iannitti, T. (2016). Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. *Journal of Clinical Pathology*. 69 (1), 187–203. doi:10.1136/jclinpath-2015-202976
18. FAO. (2016). *Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation* by Yadav S. Bajagai, Athol V. Klieve, Peter J. Dart and Wayne L. Bryden. Editor Harinder P.S. Makkar. FAO Animal Production and Health Paper No. 179. Rome.
19. FAO/WHO. (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. Ontario: FAO/WHO. Obtenido de: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
20. Fox, P., Guinee, T., Cogan, T. & McSweeney, P. (2010). *Fundamentals of cheese science*. p.537.
21. García, M. (2012). *Caracterización de la actividad de las enzimas hidrolíticas localizadas en la región cecal de cuyes (Cavia porcellus)*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
22. Gonzales, L. (2018). Efecto de los probióticos, prebióticos y simbióticos sobre la morfología intestinal y parámetros sanguíneos (serie eritrocítica y serie leucocítica) en cuyes (*Cavia porcellus*) de engorde desafiados con *Salmonella Typhimurium*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
23. Guevara, J., Tapia, N., Condorhuamán, C., Díaz, P., Carcelén, F., Peña, D. (2016). Efecto del probiótico nativo del cuy (*Cavia porcellus*) suplementado a las madres sobre el peso de las crías al nacimiento y al destete. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 18(2), 73-77. Recuperado de <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/11792>.
24. Hassanzadazar, H., Ehsani, A., Mardani, K. & Hesari, J., (2012). Investigation of antibacterial, acid and bile tolerance properties of lactobacilli isolated from Koozeh cheese. *Veterinary research forum: An international quarterly journal*, 3(3), 181–185.
25. Hu, C., Liu, L., & Yang, S. (2012). Protein enrichment, cellulase production and in vitro digestion improvement of pangolagrass with solid state fermentation. *Journal Of Microbiology, Immunology And Infection*, 45(1), 7-14. doi: 10.1016/j.jmii.2011.09.022

26. Kasana, R., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. and Gulati, A. (2008). A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Current Microbiology*, 57(5), 503-507. doi:10.1007/s00284-008-9276-8
27. Levine, U. Bearson, S. and Stanton T. (2012). *Mitsuokella jalaludinii* inhibits growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Veterinary Microbiology*. 159 (1). 115-122. doi: /10.1016/j.vetmic.2012.03.027
28. Merchant, H., McConnell, E. Liu, F., Ramaswamy, C., Kulkarni, R., Basit, A., Murdan S. (2011). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 42(1), 3-10. doi: 10.1016/j.ejps.2010.09.019.
29. Meryandini, A., Melani, V. and Sunarti, T. (2011). Addition of cellulolytic bacteria to improved the quality of fermented cassava flour. *African Journal of Food Science and Technology*. 2(2), 030-035.
30. Ministerio de Agricultura y Riego (2019). *El cuy genera oportunidades de negocio para familias rurales*. [En línea] Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minagri/noticias/27158-el-cuy-genera-oportunidades-de-negocio-para-familias-rurales> [Acceso el 15 de Mayo 2019]
31. Montaña, A., Sánchez, A., Casado, F., Beato, V., & de Castro, A. (2013). Degradation of ascorbic acid and potassium sorbate by different *Lactobacillus* species isolated from packed green olives. *Food Microbiology*, 34(1), 7-11. doi: 10.1016/j.fm.2012.11.006
32. Morales S. (2013). Sanidad en Sistemas de Crianza Comercial de Cuyes. XXXVI Reunión Científica Anual de la Asociación de Producción Animal: 38-44 https://issuu.com/rhmamanicato/docs/memoria_appa_2013.
33. Morales, S. (2017). Patógenos bacterianos y parasitarios más frecuentes en cuyes de crianza familiar - comercial en tres distritos de la Provincia de Bolognesi, Departamento de Ancash en época de seca (tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
34. Moreira, T., Marques, K., Guimarães, K., Marchesin, W., Bilego, U. & Freitas, N. (2016). Duodenal histology and carcass quality of feedlot cattle supplemented with calcium butyrate and *Bacillus subtilis*. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 38(1), 61-67. doi: 10.4025/actascianimsci.v38i1.27432.

35. Parra, R. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Scientific Electronic Library Online*, 8(1), 93-105. Obtenido de: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>
36. Sornplang, P., & Piyadeatsoontorn, S. (2016). Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *Journal Of Animal Science And Technology*, 58(1). doi: 10.1186/s40781-016-0108-2
37. Ruiz, L., Margolles, A., Sánchez, B. (2013). Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in Microbiology*. 4(396), 1-8. doi: 10.3389/fmicb.2013.00396.
38. Suckow, M., Stevens, K. and Wilson, R. (2012). *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents (American College of Laboratory Animal Medicine Series)*. Academic Press.
39. Torres, C., Carcelén, F., Ara, M., San Martín, F., Jiménez, R., Quevedo, W. y Rodríguez J. (2013). Efecto de la suplementación de una cepa probiótica sobre los parámetros productivos del cuy (*Cavia porcellus*). *Revista de Investigación Veterinaria del Perú*. 24(4). 433-440. doi: 10.15381/rivep.v24i4.2729.
40. Varel, V., Robinson, I. and Jung, H. (1984). Influence of Dietary Fiber on Xylanolytic and Cellulolytic Bacteria of Adult Pigs. *Applied Enviromental Microbiology*. 22-26.
41. Velis, G. (2017). Engorde de cuyes con dos dietas diferentes utilizando maíz chala y brócoli. (*Tesis de pregrado*). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
42. Wagner, R., Johnson, S., Rubin D. (2009). Probiotic bacteria are antagonistic to *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni* and influence host lymphocyte responses in human microbiota associated immunodeficient and immunocompetent mice. *Molecular Nutrition and Food Research*. 53(1), 377-388. doi: 10.1002/mnfr.200800101

ANEXOS

1. Resultados de cada cepa por raza

A continuación, se detalla los resultados que cada cepa evidenció en cada ensayo. Las tablas se dividen en los ítems (de Izq. a Der.):

- **CEPA:** Código de cada cepa.
- **24hrs.:** Crecimiento en caldo MRS de cada cepa en 24hrs, y leído en espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm.
- **CT:** Resultados de prueba de catalasa, negativo (N) o positivo (P).
- **GRAM:** Resultados de tinción Gram, todos fueron positivos, pero se coloca B (en caso de bacilos) o OV (en caso de morfología ovoide).
- **A:** Ensayo en agar de degradación amilolítica, en donde se detalla el tamaño del halo de degradación en milímetros.
- **P:** Ensayo en agar de degradación proteolítica, en donde se detalla el tamaño del halo de degradación en milímetros.
- **C:** Ensayo en agar de degradación celulolítica, en donde se detalla el tamaño del halo de degradación en milímetros.
- **ANT:** Ensayo en agar de antagonismo frente a *Salmonella spp.* patógena, en donde se detalla el tamaño del halo de inhibición en milímetros.
- **pH:** Porcentaje de supervivencia de cada cepa al ensayo en pH 2.0 y 4.0.
- **BILIS:** Porcentaje de supervivencia a 0.3% de bilis de cuy.

1.1 Raza Perú:

CEPA	24hrs	CT	GRAM	A	P	C	ANT	pH		BILIS
				D	D	D	D	2.0	4.0	
A1-1	1,18	N	B	0	10	0	0	0,00	0,00	0,07
A1-2	1,05	N	B	0	15	0	0	0,60	0,07	0,07
A1-3	1,92	N	B	0	16	0	0	0,00	0,07	0,27
A1-4	1,98	N	B	0	20	0	0	0,00	0,13	0,33
A1-5	1,83	N	B	5	10	0	0	0,07	0,13	0,07
A4-1	0,92	N	OV	6	16	0	0	0,13	0,00	0,33
A4-2	0,93	N	B	0	18	0	0	0,00	0,20	0,20
A4-3	1,72	N	B	0	15	0	0	0,80	0,20	0,20
A4-4	1,36	N	B	5	16	0	0	1,33	0,87	1,47
A4-5	1,3	N	B	5	19	0	0	0,00	0,20	2,47
A5-1	1,28	N	B	0	22	0	0	4,33	2,00	4,67
A5-2	1,8	N	B	5	17	0	0	0,00	3,60	0,13
A5-3	1,93	N	B	10	16	0	0	0,00	1,07	0,00
A5-4	1,86	N	B	6	18	0	0	0,60	0,33	0,27
A5-5	0,9	N	OV	5	13	0	0	0,20	0,00	0,00
B3-1	0,92	N	B	6	15	0	0	0,60	1,47	2,07
B3-2	1,02	N	B	6	20	0	0	0,40	1,07	1,73
B3-3	1,18	N	B	8	15	0	0	0,60	1,67	3,33
B3-4	1,96	N	B	0	19	0	0	0,27	1,53	3,13
B3-5	1,93	N	B	0	15	0	0	2,00	4,20	2,33
B4-1	0,82	N	B	0	9	0	0	0,00	0,00	0,00
B4-2	1,03	N	B	4	18	0	0	0,00	0,00	1,07
B4-3	1,08	N	OV	4	17	0	0	0,00	0,00	0,40
B4-4	0,7	N	B	8	17	0	0	0,00	1,27	0,47
B4-5	0,31	N	B	0	16	0	0	0,40	0,73	1,47
B5-1	1,69	N	B	5	19	0	0	0,20	2,47	2,47
B5-2	0,46	N	OV	6	0	0	0	3,60	6,80	7,07
B5-3	1,2	N	B	9	9	0	0	10,20	10,67	0,73
B5-4	0,59	N	B	0	14	0	0	1,27	1,27	1,00
B5-5	0,57	N	B	10	13	0	0	0,00	0,00	0,60
C1-1	0,96	N	B	0	16	0	0	3,80	3,67	2,20
C1-2	1,46	N	B	9	22	0	0	3,13	7,13	0,67
C1-3	1,07	N	OV	7	20	0	0	2,53	3,47	0,87
C1-4	1,92	N	B	9	10	0	0	3,47	2,07	0,00
C1-5	1,88	N	B	6	14	0	0	2,87	5,67	0,47
C2-1	1,15	N	B	11	17	0	0	0,07	0,07	0,20
C2-2	1,99	N	B	0	20	0	0	0,73	1,93	0,87
C2-3	1,56	N	OV	0	20	0	0	2,20	3,27	1,67
C2-4	0,83	N	B	0	15	0	0	5,13	4,27	1,33
C2-5	1,7	N	B	0	15	0	0	1,53	2,67	0,33
C3-1	1,8	N	B	5	10	0	0	2,67	3,53	0,00
C3-2	1,97	N	B	5	17	0	0	2,67	5,07	0,00
C3-3	1,72	N	OV	0	19	0	0	2,73	4,67	0,07
C3-4	0,98	N	B	0	19	0	11	3,07	4,33	0,07
C3-5	1,66	N	B	12	13	0	11	0,47	5,60	0,00
D1-1	1,7	N	B	0	14	0	0	1,33	3,07	0,00
D1-2	0,6	N	B	0	21	0	0	0,33	1,40	0,00
D1-3	1,65	N	B	0	19	0	0	1,53	1,40	0,00
D1-4	1,17	N	B	0	19	0	0	10,60	4,67	0,00
D1-5	0,88	N	B	6	19	0	0	1,87	1,13	0,00

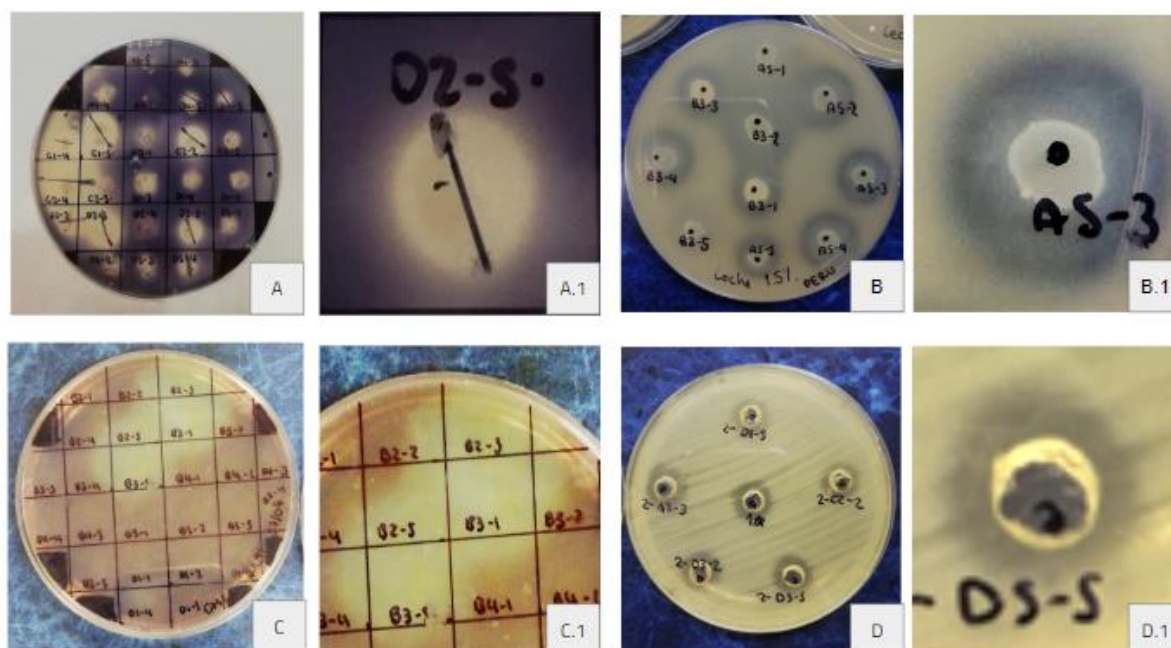
1.2 Raza Andina

	24h	CT	GRAM	A	P	C	ANT	pH		BILIS
				D	D	D	D	2	4	
A2-1	1,71	P	B	0	14	0	0	0,20	0,80	1,33
A2-2	1,85	N	B	5	16	0	0	0,00	2,27	2,67
A2-3	1,46	N	B	0	0	0	10	0,13	0,53	5,20
A2-4	1,09	N	B	0	0	0	0	-	-	-
A2-5	1,39	N	B	0	0	0	0	-	-	-
A4-1	1,91	N	OV	0	0	0	0	-	-	-
A4-2	1,88	N	OV	0	19	0	0	0,00	0,27	0,93
A4-3	1,66	P	B	7	10	0	0	0,00	0,07	0,13
A4-4	1,26	N	B	7	10	10	0	15,27	10,07	6,93
A4-5	1,9	N	B	7	10	0	0	0,20	0,60	4,33
B2-1	1,82	N	B	0	13	0	0	0,00	0,00	0,00
B2-2	0,23	N	B	0	0	0	0	-	-	-
B2-3	0,58	N	B	0	0	0	0	-	-	-
B2-4	0,73	N	B	0	0	0	9	0,13	0,00	0,00
B2-5	1,8	P	OV	0	16	0	12	0,00	0,00	0,00
B4-1	1,83	N	B	0	16	0	0	0,07	0,27	0,00
B4-2	1,6	N	B	8	12	0	0	0,00	0,20	0,00
B4-3	1,85	N	B	6	11	0	0	0,00	0,00	2,73
B4-4	0,43	N	B	0	0	0	0	-	-	-
B4-5	1,46	P	B	0	11	0	0	0,00	0,00	0,00
C1-1	1,72	N	B	0	14	0	0	0,00	0,00	0,13
C1-2	1,86	N	B	0	0	0	10	0,00	0,00	0,00
C1-3	1,37	N	B	0	0	0	9	0,60	0,53	2,13
C1-4	1,26	N	B	6	0	0	0	0,00	0,00	0,13
C1-5	1,70	N	B	17	0	0	0	0,27	3,47	1,73
C2-1	0,7	N	B	12	0	0	0	9,80	7,20	12,87
C2-2	1,82	N	B	14	0	0	0	1,87	0,20	11,33
C2-3	1,56	N	B	5	0	0	0	0,00	0,00	6,27
C2-4	1,97	P	B	19	10	0	0	0,33	0,00	2,07
C2-5	1,84	N	B	6	10	0	0	0,67	0,00	10,13
D1-1	1,47	N	B	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
D1-2	0,97	N	B	10	0	0	0	0,00	0,67	5,47
D1-3	1,02	N	B	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
D1-4	0,63	N	B	12	16	0	0	0,00	0,00	12,73
D1-5	1,95	N	B	6	15	0	0	3,67	8,67	13,33
D2-1	1,36	N	B	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
D2-2	1,9	N	B	8	14	0	0	0,00	0,00	3,20
D2-3	1,18	P	B	15	12	0	0	2,00	4,53	4,73
D2-4	1,4	N	OV	7	14	0	0	2,07	6,53	2,00
D2-5	1,14	N	B	10	0	0	0	6,00	7,67	6,93
D3-1	1,88	N	B	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
D3-2	1,06	N	B	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
D3-3	1,27	N	B	0	13	0	0	1,00	1,60	0,00
D3-4	0,9	N	B	0	10	0	0	0,00	0,00	8,07
D3-5	1,75	N	B	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
D5-1	1,26	N	B	7	0	0	0	4,80	4,00	4,67
D5-2	1,56	N	B	6	0	0	0	0,07	0,53	9,33
D5-3	1,64	N	B	9	15	0	0	0,00	0,00	4,67
D5-4	1,83	N	B	6	14	0	0	0,27	0,00	8,80
D5-5	1,99	N	B	0	15	0	9	0,00	3,40	10,00

1.3 Raza Inti

	24h	CT	GRAM	A	P	C	ANT	pH		BILIS
				D	D	D	D	2	4	
A1-1	0,6	N	B	0	0	0	0	-	-	-
A1-2	0,74	N	B	12	14	0	0	0,07	9,53	0,00
A1-3	1,59	N	OV	0	12	0	0	0,00	7,27	8,60
A1-4	0,39	N	OV	0	0	0	0	-	-	-
A1-5	0,83	N	OV	0	0	0	0	-	-	-
A2-1	0,72	N	B	17	16	0	0	0,00	13,00	8,00
A2-2	1,76	N	B	0	15	0	0	0,00	6,27	6,33
A2-3	1,31	N	B	0	18	0	0	0,00	4,47	10,87
A2-4	1,25	N	B	15	15	0	0	0,00	4,67	0,00
A2-5	0,9	N	B	15	10	0	0	0,27	1,73	4,00
A3-1	0,7	N	B	0	0	0	0	-	-	-
A3-2	0,48	N	B	0	0	0	0	-	-	-
A3-3	1,28	N	B	13	0	0	0	0,00	3,13	1,40
A3-4	1	N	B	0	0	0	0	-	-	-
A3-5	1,64	N	B	0	0	0	0	-	-	-
A4-1	0,95	N	B	16	20	0	0	0,00	1,47	2,67
A4-2	1,13	N	B	15	0	0	0	0,00	7,93	2,20
A4-3	1,5	N	B	0	0	0	0	-	-	-
A4-4	1,77	N	B	0	0	0	0	-	-	-
A4-5	1,2	N	B	0	0	0	0	-	-	-
B1-1	1,67	N	B	0	0	0	0	-	-	-
B1-2	1,1	N	B	0	15	0	0	0,00	4,20	4,60
B1-3	1,11	N	B	0	17	0	0	0,00	3,60	3,80
B1-4	1,06	N	B	0	15	16	0	0,00	4,47	3,67
B1-5	0,1	N	B	0	10	0	0	0,87	1,07	5,47
B2-1	0,8	N	OV	0	0	0	0	-	-	-
B2-2	1,77	N	B	0	0	0	0	-	-	-
B2-3	1,63	N	B	0	0	20	0	0,27	0,60	9,80
B2-4	1,12	N	B	0	0	0	0	-	-	-
B2-5	0,9	N	B	0	0	0	0	-	-	-
B3-1	1,79	N	B	0	8	24	0	2,13	1,93	3,47
B3-2	1,68	N	B	0	14	0	0	6,13	3,20	10,13
B3-3	1,5	N	B	0	19	0	0	3,33	2,80	8,00
B3-4	1,46	N	B	0	0	0	0	-	-	-
B3-5	0,94	N	B	0	0	25	0	1,67	0,93	2,60
B4-1	1,27	N	B	0	0	0	0	-	-	-
B4-2	1,76	N	B	0	16	0	0	0,00	0,00	2,33
B4-3	1,78	N	B	0	15	0	0	0,27	0,20	9,33
B4-4	1,74	N	B	0	0	0	0	-	-	-
B4-5	1,78	N	B	0	15	0	0	0,00	0,07	7,93
B5-1	1,68	N	B	0	14	0	0	3,53	0,27	3,07
B5-2	1,5	N	B	0	0	0	0	-	-	-
B5-3	1,98	N	B	0	0	0	0	-	-	-
B5-4	1,45	N	B	0	24	0	0	0,20	0,53	2,07
B5-5	1,22	N	B	0	10	0	0	0,20	0,47	3,60
D1-1	1,78	N	B	0	14	0	0	0,00	0,13	5,27
D1-2	0,36	N	B	0	0	0	0	-	-	-
D1-3	1,9	N	B	0	15	0	0	0,00	0,33	0,00
D1-4	0,97	N	B	0	15	9	0	0,00	0,40	1,67
D1-5	1,27	N	B	0	16	0	0	0,27	0,53	2,33

2.- Vista de resultados positivos a degradación enzimática y antagonismo en agar por parte de las cepas evaluadas



A	Agar amilolítico, degradación revelada con lugol.
A.1	Halo de degradación en agar amilolítico.
B	Agar proteolítico, degradación (zona transparente alrededor del crecimiento)
B.1	Halo de degradación en agar proteolítico.
C	Agar celulolítico, halo de degradación revelado con lugol.
C.1	Halo de degradación en agar celulolítico.
D	Ensayo de producción de compuestos antagónicos frente a <i>Salmonella spp.</i> aislada de casos clínicos en cuyes.
D.1	Halo de inhibición contra <i>Salmonella spp.</i>

3.- Análisis estadístico para los ensayos de degradación y antagonismo frente a *Salmonella* spp.

- **Tabla 2.** Distribución de número de cepas con capacidad de degradación amilolítica según raza de cuy

Raza de cuy	Cepas con degradación Amilolítica		Total de cepas evaluadas
	Positivo	Negativo	
Perú	27	23	50
Andina	24	26	50
Inti	7	43	50
Total según razas	58	92	150

- **Tabla 3.** Distribución de número de cepas con capacidad de degradación proteolítica según raza de cuy

Razas	Degradación Proteolítica		Total de cepas evaluadas
	Positivo	Negativo	
Perú	49	1	50
Andina	25	25	50
Inti	25	25	50
Total según razas	99	51	150

- **Tabla 4.** Distribución de número de cepas con capacidad de degradación celulolítica según raza de cuy

Razas	Degradación Celulolítica		Total de cepas evaluadas
	Positivo	Negativo	
Perú	0	50	50
Andina	1	49	50
Inti	5	45	50
Total según razas	6	144	150

- **Tabla 5.** Distribución de número de cepas con capacidad antagónica frente a *Salmonella* spp. según raza de cuy

Razas	Antagonismo frente <i>Salmonella</i> spp.		Total de cepas evaluadas
	Positivo	Negativo	
Perú	2	48	50
Andina	6	44	50
Inti	0	50	50
Total según razas	8	142	150