



ANEXO 1

FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN
CON EL FINANCIAMIENTO DEL FEDU

1. Título del proyecto

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS NATIVAS CON CARÁCTER PROBIOTICO AISLADAS DEL CONTENIDO INTESTINAL EN CRIAS DE ALPACAS

2. Área de Investigación

Área de investigación	Línea de Investigación	Disciplina OCDE
	SALUD ANIMAL	

3. Duración del proyecto (meses)

12 MESES

4. Tipo de proyecto

<u>Individual</u>	<input type="radio"/>
<u>Multidisciplinario</u>	<input checked="" type="radio"/>
<u>Director de tesis pregrado</u>	<input type="radio"/>

4. Datos de los integrantes del proyecto

Apellidos y Nombres	Orós Butrón, Oscar David Zanabria Huisa, Víctor Melitón
Escuela Profesional	Medicina Veterinaria y Zootecnia
Celular	951679484 951650808
Correo Electrónico	odoros@unap.edu.pe vzanabria@unap.edu.pe

- I. Título (El proyecto de tesis debe llevar un título que exprese en forma sintética su contenido, haciendo referencia en lo posible, al resultado final que se pretende lograr. Máx. palabras 25)

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS NATIVAS CON CARÁCTER PROBIOTICO AISLADAS DEL CONTENIDO INTESTINAL EN CRIAS DE ALPACAS

- II. Resumen del Proyecto de Tesis (Debe ser suficientemente informativo, presentando -igual que un trabajo científico- una descripción de los principales puntos que se abordarán, objetivos, metodología y resultados que se esperan)

El trabajo de investigación se realizará en el Centro Experimental La Raya de la Universidad Nacional del Altiplano y su respectivo laboratorio de bacteriología; ubicado en el Distrito de Santa Rosa de Melgar -Puno. El objetivo es; Identificar y evaluar las bacterias ácido lácticas benéficas presentes en la materia fecal y sus características prebióticas. Para ello se utilizará



heces obtenidas de la ampolla rectal de 5 crías de alpaca, para poder aislar e identificar especies de *Lactobacilos spp*, sembrar en agar Man Rogosa Sharp (MRS) para su desarrollo o crecimiento de las bacterias, una vez logradas, se identificarán las cepas aisladas con pruebas bioquímicas convencionales. Para determinar la capacidad probiótica de estas cepas se hará mediante pruebas de resistencia a sales biliares (0.05, 0.1, 0.15 y 0.3%), resistencia a pH ácido (pH 3, 4, 5.6, 7), tolerancia a NaCl (2, 4, 6, 8, 10%) y actividad antagónica (*Salmonella sp* y *Escherichia coli*). Los resultados obtenidos en la presente investigación serán de utilidad para formular productos probióticos para la prevención y tratamiento de enfermedades gastrointestinales en crías de alpacas.

III. Palabras claves (Keywords) (Colocadas en orden de importancia. Máx. palabras: cinco)

Alpacas, bacterias acidolácticas, carácter probiótico, microbiota nativa

IV. Justificación del proyecto (Describe el problema y su relevancia como objeto de investigación. Es importante una clara definición y delimitación del problema que abordará la investigación, ya que temas cuya definición es difusa o amplísima son difíciles de evaluar y desarrollar)

La crianza de alpacas en ambientes comunales es prácticamente de subsistencia, caracterizadas por un pobre rendimiento productivo, con reducidas tasas de fertilidad y elevadas pérdidas neonatales que desgraciadamente no pueden ser analizadas por carencia de registros productivos y sanitarios. Las empresas sociales, contrariamente, manejan registros poblacionales y sanitarios, incluyendo causas de muertes basadas en diagnósticos de campo y en informes semanales ("quiebras"). Estos reportes, aunque no muy eficientes, son depositarios de incidencias de mortalidades calendarizadas y por edades (crías, tuis y animales adultos) que permiten analizar el comportamiento de pérdida de animales en una determinada región geográfica y tiempo (Ameghino & Martini, 1991)(Ameghino & Martini, 1991; Ramírez & Fernández-Baca, 1991). La recolección y análisis de informes mensuales de mortalidad neonatal evidencia que las mayores mortalidades ocurren en animales neonatos hasta los 30 días de edad (Ameghino & Martini, 1991).

Existen investigaciones que demuestran el efecto benéfico en la salud con el uso de probióticos; en cerdos realizado por (Mendez et al., 2012) y en la cría de terneros hecho por (Palencia et al., 2005), en el control de enfermedades gastrointestinales como las diarreas en infantes realizada por (Vázquez, 2013), no encontrándose investigaciones similares en alpacas y menos en nuestro medio como el altiplano puneño.

Con la era de la antibioterapia, hasta hoy no se ha observado un real control de las enfermedades infecciosas especialmente en crías, más aún se generó la aparición de resistencia bacteriana, con la consecuente dependencia del uso de nuevos fármacos cuyos costos se van incrementando cada vez más. Por consiguiente, es importante buscar nuevas alternativas en cuanto se refiere a tratamiento y prevención, con menor costo y mayor efectividad, que beneficiaran a mejorar las condiciones socio-económicas del productor alpaquero.

De tal manera que mi propósito es evaluar su carácter probiótico de bacterias acidolácticas aisladas del contenido intestinal de crías de alpacas y su posterior uso en la prevención de enfermedades infecciosas gastrointestinales en crías de alpaca, consiguiendo una mejora de la respuesta inmune que protegerá a los animales por un periodo mucho más duradero y efectivo contra enfermedades infecciosas causantes incluso de mortalidad.

V. Antecedentes del proyecto (Incluya el estado actual del conocimiento en el ámbito nacional e internacional. La revisión bibliográfica debe incluir en lo posible artículos científicos actuales, para evidenciar el conocimiento existente y el aporte de la Tesis propuesta. Esto es importante para el futuro artículo que resultará como producto de este



trabajo)

Los intestinos son el área más expuesta a microorganismos y antígenos dietarios. El epitelio intestinal es un importante componente de la barrera de la mucosa intestinal, el cual debe discriminar adecuadamente entre bacterias patógenas y no patógenas. Estudios han demostrado que la microbiota bacteriana comensal y sus componentes, son factores importantes en la patogénesis de varias enfermedades gastrointestinales. Aunque estudios experimentales han demostrado que prebióticos, probióticos y simbióticos ejercen efectos antibacterianos, modulación inmune y antiinflamatorios, lo cual puede ser beneficioso en algunas enfermedades gastrointestinales, su real papel en el ser humano. Porque no todos poseen el mismo efecto terapéutico, colonización con específicos probióticos y simbióticos (incluyendo la ingeniería bacteriana para secretar citoquinas anti-inflamatorias y restaurar la flora comensal y la tolerancia intestinal) podría ser una alternativa para el tratamiento de las enfermedades gastrointestinales y otras enfermedades inmunológicas (Quera et al., 2005)

Se aislaron bacterias y levaduras de las muestras de estiércol y se determinó la capacidad probiótica de estas cepas mediante pruebas de resistencia a sales biliares (0.05, 0.1, 0.15 y 0.3%), resistencia a pH ácido (pH 3, 4, 5.6, 7), tolerancia a NaCl (2, 4, 6, 8, 10%) y actividad antagónica (*Salmonella spp* y *Escherichia coli*). Nueve microorganismos fueron identificados y tres pasaron las pruebas de tolerancia. Se determinó la capacidad antagónica frente a bacterias patógenas (*Salmonella sp* y *E. coli*), evidenciada por halos (mm) de las tres cepas seleccionadas. La identificación de las cepas se realizó por los métodos bioquímicos API 50 CHL V5.1 para *Lactobacillus* y API 20 AUX para levaduras (Castillo et al., 2018).

La investigación sobre la preparación, usos e importancia, de cepas con carácter probiótico, especialmente las cepas de yogur utilizadas en crías de vacunos dentro del primer mes de nacidos contribuyendo a instalar una microbiota beneficiosa (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) en el tracto intestinal, que ayudan a poblar el intestino y protegen de enfermedades gastrointestinales, además durante el periodo neonatal a mejorar el desarrollo del sistema inmunológico. Este producto en las crías facilita la asimilación de importantes nutrientes para la salud animal, logrando incrementar de peso vivo, talla y resistencia contra las enfermedades (Palencia et al., 2005)

Actualmente en discusión la importancia del uso de probióticos como alternativa al uso de antibióticos en la producción animal, así como los mecanismos por los cuales la acción de los probióticos favorece a la salud del animal. El uso de los microorganismos nativos con capacidad probiótica es una alternativa terapéutica para el tratamiento y prevención de algunas enfermedades en animales. En el caso de las afecciones gastrointestinales de los animales jóvenes criados en condiciones artificiales su uso puede prevenir la colonización del tracto intestinal por patógenos, estimular al sistema inmune y contrarrestar el efecto negativo de dichas patologías. El uso de probióticos, aisladas a partir de distintas regiones anatómicas de los animales o de los alimentos que estos consumen permitirá mejorar las condiciones de salud y producción de las explotaciones intensivas (Rosmini et al., 2004).

Se estudiaron probióticos en diarrea aguda infecciosa, diarrea asociada a antibióticos, prevención de enterocolitis necrosante en neonatos de bajo peso al nacer, tratamiento de erradicación para *Helicobacter pylori*, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome de intestino irritable, dolor abdominal funcional, cólico del lactante, síndrome de intestino corto y enfermedades infecciosas extraintestinales, se muestra que existe evidencia para el uso de probióticos en diversos padecimientos gastrointestinales. Es importante indicar que no todos los probióticos son iguales y que los resultados de uno, no pueden equivalerse a otro, es decir, son cepas distintas, así como en la mayoría de la evidencia, asimismo la dosis (Vázquez, 2013).

VI. Hipótesis del trabajo (Es el aporte proyectado de la investigación en la solución del problema)

A partir del contenido intestinal de crías de alpacas se aislarán e identificara cepas bacterianas benéficas con características probióticas

VII. Objetivo general



Aislar e identificar bacterias nativas con carácter probiótico aisladas del contenido intestinal en crías de alpacas

VIII. Objetivos específicos

- Aislar e identificar bacterias acidolácticas, del contenido intestinal de crías de alpacas de una semana de edad en el C.E. La Raya, UNA Puno.
- Determinar la tolerancia al cambio de pH 3, 4, 5, 6 y 7, de cepas aisladas del contenido intestinal de crías de alpaca de una semana de edad en el C. E. La Raya UNA – Puno
- Determinar la tolerancia a sales biliares (0.05, 0.1, 0.15, 0.3%, de cepas aisladas del contenido intestinal de crías de alpaca de una semana de edad en el C. E. La Raya UNA – Puno
- Determinar la tolerancia a altas concentraciones de sal 2, 4, 6, 8 y 7, de cepas aisladas del contenido intestinal de crías de alpaca de una semana de edad en el C. E. La Raya UNA – Puno
- Determinar la capacidad antagonica contra *Salmonella* spp y *Escherichia coli* d cepas aisladas del contenido intestinal de crías de alpaca de una semana de edad en el C. E. La Raya UNA - Puno

IX. Metodología de investigación (Describir el(los) método(s) científico(s) que se empleará(n) para alcanzar los objetivos específicos, en forma coherente a la hipótesis de la investigación. Sustentar, con base bibliográfica, la pertinencia del(los) método(s) en términos de la representatividad de la muestra y de los resultados que se esperan alcanzar. Incluir los análisis estadísticos a utilizar)

- Obtención de las muestras. Las de heces de obtendrán de crías de alpacas de 1 semana de nacido, colectadas en medio de transporte (Caldo de peptona) para trasladarlos al laboratorio de microbiología del C.E. La Raya UNA Puno en condiciones de refrigeración dentro de las 2 horas de colectada la muestra.
- Siembra y aislamiento. La siembra primaria de las muestras de heces se realizará en agar Man Rogosa Sharp (MRS) por el método directo por estriación e incubadas a 37°C en condiciones de microaerofilia por 24 horas, luego se seleccionará colonias pequeñas, redondas de coloración blanquecina a cremosas para poder ser repicadas en un nuevo medio de cultivo MRS e incubadas bajo las mismas condiciones que la siembra primaria, a las 24 horas se procede a confirmar las características de la colonia y comprobadas a la tinción Gram que sean bacilos o cocos Gram positivos a los cuales se les considerará como especie del Género *Bacillus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Bifidobacterium* y continuar con las pruebas bioquímicas para su identificación.
- Identificación de las Cepas. La identificación de las cepas aisladas se realizarán pruebas bioquímicas convencionales para su identificación de acuerdo a las especificaciones dadas por (MacFaddin, 2003).
- Capacidad probiotica. Para determinar la capacidad probiótica de estas cepas se hará mediante pruebas de resistencia a sales biliares (0.05, 0.1, 0.15 y 0.3%), resistencia a pH ácido (pH 3, 4, 5.6, 7), tolerancia a NaCl (2, 4, 6, 8, 10%) y actividad antagonica (*Salmonella* sp y *Escherichia coli*) según (Avila et al., 2010; Kociubinskik et al., 1999; Montegudo et al., 2012; Rondon et al., 2008; Rubio et al., 2008; Zavaglia et al., 1998).
- Los datos de la variable en estudio serán analizados mediante la prueba estadística de “t”, y los resultados se presentarán utilizando medidas de tendencia central y de dispersión.

X. Referencias (Listar las citas bibliográficas con el estilo adecuado a su especialidad)

- Ameghino, E., & Martini, J. (1991). Mortalidad en crías de alpacas. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima (Peru). Centro de Investigación Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura*, 73(5), 128.
- Avila, J., Avila, M., Tovar, B., Brizuela, M., Perazzo, Y., & Hernandez, H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Revista Científica Universidad de Zulia-Venezuela*, 20(6), 161–169.
- Castillo, P. L., Betancur, C. A., & Pardo, E. (2018). Caracterización de microorganismos con potencial probiótico aislados de estiércol de terneros Brahman en Sucre, Colombia. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(2), 438–448. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14482>
- Kociubinskik, G., Perez, P., & De-Antoni, G. (1999). Screening of bile resistance and bile of precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Food Protection*, 62, 905–912.
- MacFaddin, J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* (3rd ed.). Editorial Médica Panamericana S.A.
- Mendez, M., VVilla, A., Castro, G., Vazquez, F., Mendez, N., Huerta, R., & Aragon, A. (2012). INCLUSION DE PREBIÓTICOS Y PROBIÓTICOS EN LA DIETA DE CERDOS, SU EFECTO EN COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y CALIDAD EN LA CANAL. *Memorias: VII Cátedra CUMEX, Aline Schunemann*, 1(1), 67–71.
- Monteagudo, A., Rodriguez, L., Rúa, J., Martinez, H., Navasa, N., García, M., & Ferrero, M. (2012). In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *J. Functional Food*, 4(1), 531–541. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.02.014>
- Palencia, S., Cespedes, L., Nubiola, Y., Reyes, I., Miravet, R., Vallejo, O., Rodríguez, Y., Soto, V., & Blanco, A. (2005). La cepa de yogur como probiótico, una alternativa en la salud y mejora del ternero. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, VI(9), 1–35.
- Quera, R., Quigley, E., & Madrid, A. (2005). El rol de los prebióticos, probióticos y simbióticos en gastroenterología. *Gastroenterol. Latinoam*, 16(3), 218–228. <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILA CS&lang=p&nextAction=Ink&exprSearch=433863&indexSearch=ID>
- Ramírez, A., & Fernández-Baca, S. (1991). Enfermedades infecciosas. *Y Perspectivas Del Conocimiento de Los Camélidos ...*
- Rondon, A. ., Samaniego, L. ., Bocourt, R., Rodriguez, S., Milian, G., Ranilla, M. ., Laurencio, M., & Perez, M. (2008). Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. Procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Rev. Somenta (Mexico)*, 6(1), 56–63.
- Rosmini, M., Sequeira, G., Gerrero-Legarreta, I., Marti, L., Dalla-Santina, R., Frizzo, L., & Bonazza, J. (2004). Probiotic Production for Meat Animals: Importance of Using indigenous intestinal microbiota. *Revista Mexicana de Ingenieria Química*, 3(1), 181–191.
- Rubio, M. ., Hernandez, E. ., Aguirre, R. ., & Poutou, P. . (2008). Identificación preliminar in vitro de propiedades probióticas en cepas de *S. cerevisiae*. *Revista MVZ Cordova*, 13(1), 1157–1169.
- Vázquez, R. (2013). Utilidad de los probióticos en pediatría. *Revista Gastrohnutp*, 2(1), 60–65. <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/handle/10893/6007>
- Zavaglia, A., Kocibinski, G., Perez, P., & De-Antoni, G. (1998). Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. *Journal of Food Protection*, 61, 865–873.



XI. Uso de los resultados y contribuciones del proyecto (Señalar el posible uso de los resultados y la contribución de los mismos)

El uso de probióticos nativos en la prevención de enfermedades infecciosa en crías de alpacas, se verá disminuida evitando el uso de antibióticos comerciales

XII. Impactos esperados

i. Impactos en Ciencia y Tecnología

Se generará un conocimiento aplicada de una investigación aplicada para la gran mayoría de los alpaqueros de la región y nacional, igualmente, para el centro experimental y se acumulará en el conjunto de sabidurías del manejo de camélidos.

ii. Impactos económicos

Esta tecnología evitará la mortalidad de las crías y así lo logrará mayor número de crías alpacas al desteta y reemplazo de hembras a la majada y el número de animales de saca, y con este último genera ingreso económico para el centro y/o criadores.

iii. Impactos sociales

Con la práctica de este método de tratamiento alternativo, serán de utilidad en la crianza de camélidos aceptada por los criadores dentro del ámbito de la crianza de alpacas.

iv. Impactos ambientales

Con el uso alternativo de probióticos se evitará el uso indiscriminado de antibióticos. Asimismo, con el aumento de la población de alpacas de buena calidad zootécnica contribuirán a no contaminar el ambiente con la producción de metano, comparado al de vacunos.

XIII. Recursos necesarios (Infraestructura, equipos y principales tecnologías en uso relacionadas con la temática del proyecto, señale medios y recursos para realizar el proyecto)

Equipos de laboratorio

- Estufa
- Autoclave
- Horno eléctrico
- Equipo de baño Maria equipo de siembra (mechero, asa de kolle)
- Homogeneizador vortex
- Espectrofotometro
- Refrigerador

Medios de cultivo

- Agar TSA (trypticase soy agar)
- Agar MRS (man rogosa sharpe)
- Agar TSI (triple sugar iron agar)
- Citrato de Simmons
- SIM (sulfuro indol movilidad)



- Reactivo oxidasa
- Peróxido de hidrogeno
- LIA (lisina iron agar)

XIV. Localización del proyecto (indicar donde se llevará a cabo el proyecto)

El trabajo de investigación se realizará en el Centro Experimental La Raya de la Universidad Nacional del Altiplano, Región Puno, ubicado en el distrito de Santa Rosa, Provincia de Melgar, Región Puno

XV. Cronograma de actividades

Actividad	MESES AÑO 2021											
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Redacción y presentación de proyecto	X	X	X									
Aceptación del proyecto			X									
Ejecución del trabajo de investigación			X	X	X	X	X	X	X			
Recolección de datos			X	X	X	X	X	X	X			
Análisis de información									X	X	X	
Redacción de resultados					X						X	
Presentación del informe final											X	X

XVI. Presupuesto

Descripción	Unidad de medida	Costo Unitario (S/.)	Cantidad	Costo total (S/.)
EQUIPOS, MAT.				
TSA (Trypticase Soy Agar)	Fco/500 g.	340.00	1	340.00
Caldo MRS	Fco/500 g.	270.00	1	270.00
Agar MRS	Fco/500 g.	380.00	1	440.00
Medio McConkey	Fco/500 g	300.00	1	300.00
Triple Sugar Iron Agar	Fco/2500.00	220.00	1	220.00
Citrato Simons	Fco/250.00	230.00	1	230.00
Sulfuro Indol Movilidad	Fco/250.00	190.00	1	190.00
Analisis pruebas bioquimicas	Unidad	40.00	50	2000.00
Reactivo Oxidasa	Sobre/100 tiras	80.00	1	80.00
Proceso Liofilizacion	Global	500.00	1	500.00
Bateria coloración Gram	Kit/250mL C/U	50.00	4	200.00
TOTAL S/.				4770.00

Puno, 15 de marzo del 2021