

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



“BACTERIAS CELULOLÍTICAS CON CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS DEL
INTESTINO DE TERMITAS Y SU EVALUACIÓN COMO POTENCIALES
DEGRADADORAS DE TOTORA (*Schoenoplectus tatora*)”

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. DIEGO SIWAR LOAIZA CENTENO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS

“BACTERIAS CELULOLÍTICAS CON CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS DEL
INTESTINO DE TERMITAS Y SU EVALUACIÓN COMO POTENCIALES
DEGRADADORAS DE TOTORA (*Schoenoplectus tatora*)”

PRESENTADA POR:

Br. DIEGO SIWAR LOAIZA CENTENO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 23 DE OCTUBRE DEL 2017

APROBADO POR EL JURADO REVISOR:

PRESIDENTE:

Blgo. Herminio Rene Alfaro Tapia

PRIMER MIEMBRO:

M.Sc. Vicky Cristina Gonzales Alcos

SEGUNDO MIEMBRO:

Mg. Maria Isabel Vallenias Gaona

DIRECTOR / ASESOR:

Dr. Juan José Pauro Roque

Área : Ciencias Biomédicas
Línea : Diagnóstico y Epidemiología
Tema : Biotecnología Microbiana

DEDICATORIA

*A mis amados padres: Dionicio Loaiza Quispe
y Asunta Centeno Carrasco, que siempre me
Apoyaron en todo y tuvieron fe en mi desde
El principio.*

*A mi hermana: Rosario Fernanda Loaiza Centeno
Y todos mis familiares cercanos, por ser mi alegría
Y motivación de cada día.*

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Ciencias Biológicas y toda la plana de docentes que me instruyo y guio en toda mi formación académica.

A mis padres que siempre me apoyaron, aconsejaron y guiaron para culminar mis estudios universitarios de manera satisfactoria.

Y a todas aquellas personas que me apoyaron de manera directa e indirecta para culminar mis estudios y en el desarrollo de mi tesis.

ÍNDICE GENERAL

	PÁG.
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	
RESUMEN.....	14
ABSTRACT	15
I. INTRODUCCIÓN.....	16
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	19
2.1. ANTECEDENTES	19
a) Estructura química de la celulosa.....	21
b) Degradación de la celulosa	22
1. Enzimas degradadoras de celulosa.....	22
2. Microorganismos celulolíticos	23
3. Actividad enzimática de los microorganismos en la degradación de la celulosa	24
4. Factores que determinan la actividad enzimática de las celulasas.....	24
- Sinergismo.....	24
- Absorción	25
c) Usos de las enzimas degradadoras de celulosa y su utilidad industrial	25
2.2.2. Termitas	27
a) Biología	27
b) Ciclo de desarrollo.....	29
Adultos (Diferenciación en castas)	30
- Obreras.....	30
- Soldados.....	30
- Reproductores o imagos	30
c) Alimentación	31

d) Microbiota intestinal de las termitas	31
e) Influencia de las termitas en la sociedad.....	32
2.2.3. Probióticos.....	33
a) Beneficios de los probióticos y mecanismos de acción	34
- Estimulación de la respuesta inmune.....	34
- Producción de antimicrobianos	35
- Competencia por la adhesión con patógenos a los receptores.....	35
- Competencia por Nutrientes.....	36
b) Microorganismos probióticos.....	36
c) Criterios de selección de probióticos.....	38
2.2.4. La totora (<i>Schoenopletus tatora</i>).....	39
a) Ubicación sistemática de la totora	39
- Número de cromosomas	40
- Crecimiento	40
c) Composición bioquímica de la totora.....	41
2.2.5. Marco Conceptual	42
III. MATERIALES Y MÉTODOS	44
3.1. Ámbito de estudio.....	44
Clave dicotómica de identificación descrita por (Syaukani & Thompson, 2011).....	44
3.2. Tipo de investigación	46
3.3. Metodología.....	46
a. Aislamiento e identificación de bacterias celulolíticas del intestino de termitas.....	46
Fundamentos de los métodos utilizados:.....	46
- Punción por aguja fina (PAAF).....	46
- Aislamiento primario en medio líquido.....	46
- Aislamiento en medio sólido	47
- Ensayo de difusión en placa de agar utilizando rojo congo.....	48

Identificación de bacterias aisladas.....	51
- Prueba en Agar hierro tres azúcares (TSI).....	51
- Prueba de Agar lisina hierro agar (LIA).....	51
- Prueba del Citrato.....	52
- Prueba del SIM (Hidrogeno sulfurado, Indol, Movilidad).....	52
- Tinción Gram.....	53
- Prueba de la catalasa.....	54
b. Evaluación de las características probióticas <i>in vitro</i> de las bacterias celulolíticas.....	54
1) Prueba de tolerancia a distintos niveles de temperatura.....	56
2) Prueba de tolerancia a sales biliares.....	57
3) Prueba de tolerancia al cloruro de sodio (NaCl).....	58
4) Prueba de tolerancia a distintos valores de pH.....	58
5) Prueba de antagonismo.....	59
Análisis estadístico.....	59
c. Determinación del potencial de las bacterias celulolíticas en la degradación de la totora (<i>Schoenoplectus tatora</i>) en condiciones controladas.....	61
Análisis estadístico.....	64
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
4.1. Aislamiento e identificación de bacterias del intestino de termitas con capacidad celulolítica.....	65
4.2. Evaluación de las características probióticas <i>in vitro</i> de las bacterias celulolíticas, mediante tolerancia a temperatura, sales biliares, cloruro de sodio, pH y pruebas de antagonismo.....	69
4.2.1. Prueba de tolerancia a distintos niveles de temperatura.....	69
4.2.2. Prueba a tolerancia a sales biliares.....	71
4.2.3. Prueba de tolerancia al Cloruro de Sodio (NaCl).....	74
4.4.4. Prueba de tolerancia distintos niveles de pH.....	76
4.4.5. Pruebas de antagonismo.....	79

4.3.Determinación del potencial de las bacterias celulolíticas mediante tiempos de degradacion de la totora (<i>Schoenoplectus tatora</i>) en condiciones controladas	80
4.3.1. Prueba de los azúcares reductores por el método DNS	80
4.3.2. Prueba de digestibilidad de la totora	83
V. CONCLUSIONES	88
VII. REFERENCIAS	90
ANEXOS	98

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1. Estructura química de la celulosa (Gracia, 2012).....	21
Figura 2. Regiones cristalinas y amorfas en la estructura de la celulosa (Gaitan & Lara, 2007).....	22
Figura 3. Proceso de degradación enzimática de la celulosa (Lara, 2005).....	23
Figura 4. Esquema del proceso de sacarificación de residuos lignocelulósicos (Macarron, 1992).....	27
Figura 5. Mecanismos de acción de los probióticos (World Gastroenterology Organisation, 2011).....	36
Figura 6. a) Árbol infestado por termitas donde se aprecia el termitero de las mismas en la ciudad de Massiapo, Mayo 2017, b) Termitero amoldado al tamaño de la caja tecnopor forrado internamente con papel aluminio.....	44
Figura 7. Especie de termita recolectada en Massiapo, identificada como <i>Nasutitermes longinasus</i> en el laboratorio de microbiología, Mayo 2017.....	45
Figura 8. Proceso de aislamiento de bacterias celulolíticas del intestino de termitas en el laboratorio del CERITSS-Puno, Mayo 2017.....	49
Figura 9. Proceso de aislamiento de bacterias celulolíticas en medio sólido realizado en el laboratorio del CERITSS-Puno, Mayo 2017.....	50
Figura 10. Preparación del inóculo final con la escala de McFarlam 0.5 en el laboratorio del CERITSS-Puno, Junio 2017.....	55
Figura 11. Fórmula de porcentaje de supervivencia a sales biliares. Fuente: (Cueto <i>et al.</i> , 2010).....	56
Figura 12. Fórmula para conteo en placa de bacterias. Fuente: (Izurieta, 2011).....	58
Figura 13. Desarrollo de la curva de calibración de la glucosa en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA-Puno, Junio 2017.....	63
Figura 14. Fórmula para determinar el porcentaje de digestibilidad. Fuente: (Sosa <i>et al.</i> , 2006).....	63
Figura 15. Resultados del aislamiento de bacterias celulolíticas obtenidas en el laboratorio del CERITSS-Puno, Junio 2017.....	67
Figura 16. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las bacterias por 10^8 UFC/ml asiladas del intestino de termitas; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con la letra común B no son significativamente diferentes entre si $p > 0.05$).	69

Figura 17. Efecto de las sales biliares sobre el crecimiento de las bacterias intestino de termitas por 10^8 UFC/ml asiladas del; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común A no son significativamente diferentes $p>0.05$).....	72
Figura 18. Densidad poblacional final de bacterias tolerantes distintas concentraciones de sales biliares por 10^8 UFC/ml asiladas del intestino de termitas; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común A no son significativamente diferentes entre sí $p>0.05$).....	73
Figura 19. Porcentaje de supervivencia las bacterias asiladas del intestino de termitas; a distintas concentraciones de sales biliares; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común B no son significativamente diferentes $p>0.05$).	74
Figura 20. Efecto del cloruro de sodio (NaCl) sobre el crecimiento de las bacterias asiladas del intestino de termitas por 10^8 UFC/ml; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con letras distintas A, B y C son significativamente diferentes $p<0.05$).	75
Figura 21. Efecto del pH sobre el crecimiento de las bacterias asiladas del intestino de termitas por 10^8 UFC/ml; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común A no son significativamente diferentes $p>0.05$).....	76
Figura 22. Densidad poblacional final de bacterias asiladas del intestino de termitas tolerante a distintos niveles de pH por 10^8 UFC/ml; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común A no son significativamente diferentes $p>0.05$).	77
Figura 23. Porcentaje de supervivencia de bacterias asiladas del intestino de termitas frente a distintos niveles de Ph; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común B no son significativamente diferentes $p>0.05$).....	78
Figura 24. Azúcares reductores producidos por las bacterias aisladas del intestino de termitas a las 24 horas de incubación; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra distinta A, B y C son significativamente diferentes $p>0.05$).	81
Figura 25. Azúcares reductores producidos por las bacterias aisladas del intestino de termitas a las 48 horas de incubación; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común A o B no son significativamente diferentes $p>0.05$).....	82
Figura 26. Azúcares reductores producidos por las bacterias aisladas del intestino de termitas a las 72 horas de incubación; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común B no son significativamente diferentes $p>0.05$).....	82
Figura 27. Azúcares reductores producidos por las bacterias aisladas del intestino de termitas en 3 tiempos distintos de incubación; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común A no son significativamente diferentes $p>0.05$).....	83

- Figura 28. Porcentaje de digestibilidad producidos por las bacterias aisladas del intestino de termitas en 3 tiempos distintos de incubación; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común B no son significativamente diferentes $p>0.05$)...... 84
- Figura 29. Porcentaje de digestibilida de la totora producidos por las bacterias aisladas del intestino de termitas a las 24 horas de incubación; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común A o B no son significativamente diferentes $p>0.05$). 85
- Figura 30. Porcentaje de digestibilida de la totora producidos por las bacterias aisladas del intestino de termitas a las 48 horas de incubación; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común A o B no son significativamente diferentes $p>0.05$). 85
- Figura 31. Zona de toma de muestra (1) de termitas (*Nasutitermes longinasus*), Massiapo – Sandia, Mayo 2017..... 98
- Figura 32. Zona de toma de muestra (2) de totora (*Schoenoplectus tatora*), Chucuito– Puno, Mayo 2017..... 98
- Figura 33. Escala de turbidez de McFarlam realizada en el laboratorio de bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA-Puno, Junio 2017..... 100

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁG.
Tabla 1. Nomenclatura para los microorganismos probióticos (World Gastroenterology Organisation, 2011).	37
Tabla 2. Microorganismos probióticos de casas comerciales (World Gastroenterology Organisation, 2011).	37
Tabla 3. Composición mineral de la totora (Collot, 1980).	42
Tabla 4. Clave de identificación de enterobacterias.	53
Tabla 5. Caracterización de las bacterias aisladas con CMC al 2% p/v en el laboratorio del CERITSS-Puno, Junio 2017 (Terragno <i>et al.</i> , 2007).	65
Tabla 6. Caracterización de las bacterias aisladas con CMC al 1% p/v en el laboratorio del CERITSS-Puno, Junio 2017.	66
Tabla 7. Identificación del género de las bacterias seleccionadas para las pruebas probióticas en el laboratorio del CERITSS-Puno, Junio 2017.	68
Tabla 8. Prueba de antagonismo de las cepas bacterianas seleccionadas frente a <i>Escherichia coli</i> ; Puno, Abril a Junio del 2017.	79
Tabla 9. Escala de McFarlam (CDC & OMS, 2009).	100
Tabla 10. Resultados cuantitativos de la prueba de tolerancia a temperatura; Puno, Abril a Junio del 2017.	103
Tabla 11. Resultados cuantitativos de la prueba de tolerancia a sales biliares; Puno, Abril a Junio del 2017.	104
Tabla 12. Resultados cuantitativos de la prueba de resistencia al cloruro de sodio; Puno, Abril a Junio del 2017.	105
Tabla 13. Resultados cuantitativos de la prueba de tolerancia a pH; Puno, Abril a Junio del 2017.	106
Tabla 14. Resultados de la prueba de azúcares reductores con el reactivo DNS; Puno, Abril a Junio del 2017.	107
Tabla 15. Resultados de la prueba de digestibilidad de la totora; Puno, Abril a Junio del 2017.	108

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

LB	Luria Bertani Medium
TSA	Tripticasa Soya Agar.
UFC	Unidades Formadoras de Colonia.
g	Gramos.
l	Litro.
p	Peso.
v	Volumen.
ml	Mililitros.
rpm	Revoluciones por Minuto.
cm	Centímetros.
CMC	Carboximetilcelulosa
DNS	Acido 3,5-dinitrosalicílico
HCl	Ácido Clorhídrico
UTM	Universal Transverse Mercator
D.O.	Densidad Óptica
CERITSS	Centro de referencia de infecciones de transmisión sexual VIH/SIDA

RESUMEN

Las bacterias probióticas constituyen en la actualidad un gran apoyo para la crianza de animales, sin embargo su disponibilidad no es muy abundante comercialmente, pero si existente en distintos hábitats en la naturaleza, como en el intestino de las termitas. Estas tienen la capacidad de mejorar la salud de los animales, ayudarles a ganar peso y de proveer defensa inmunitaria adicional. La investigación se realizó en el laboratorio del Centro de referencia de infecciones de transmisión sexual y en los laboratorios de Microbiología y Bioquímica en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano - Puno de Abril a Junio del 2017. Los objetivos de esta investigación fueron: a) aislar bacterias del intestino de termitas con capacidad celulolítica e identificar las que produzcan los mayores halos de hidrólisis de celulosa, b) evaluar las características probióticas *in vitro* de las bacterias celulolíticas, mediante tolerancia a temperatura, sales biliares, cloruro de sodio (NaCl), pH y pruebas de antagonismo y c) determinar el potencial de las bacterias celulolíticas mediante tiempos de degradación de la totora (*Schoenoplectus tatora*) en condiciones controladas. Las bacterias fueron aisladas del intestino de termitas (*Nasutitermes longinasus*) usando el medio de cultivo Luria Bertani incorporado con Carboximetilcelulosa (CMC) al 1% y al 2% p/v, luego de ello se seleccionaron 4 bacterias con más eficiencia de hidrolizar la celulosa, las cuales fueron *Escherichia spp.* (BC3), *Micrococcus spp.* (BDC4), *Enterobacter spp.* (BDC10) y *Micrococcus spp.* (BDC11). Estas luego fueron sometidas a pruebas probióticas de tolerancia a distintos niveles de temperatura, sales biliares, cloruro de sodio, pH y pruebas de antagonismo, todas con un inóculo inicial de 1.5×10^8 UFC/ml, en la que resultó que las bacterias *Enterobacter spp.* (BDC10) y *Micrococcus spp.* (BDC11) fueron las que tuvieron el mejor rendimiento incrementando su densidad poblacional de 10^8 a 10^9 UFC/ml, demostrando ser bacterias con características probióticas. En las pruebas de degradación de la totora resultaron ser mejores las bacteria BC3 (0.49 g/l) y BDC10 (0.39 g/l) en liberar azúcares reductores en el tiempo de 72 horas. En la prueba de digestibilidad las bacterias BC3 (24%) y BDC11 (23.5%) fueron las más eficientes digiriendo la totora, pero estas no mostraron diferencia estadística con la bacteria BDC10 (19%).

Palabras Clave: Bacterias celulolíticas, bacterias probióticas, potencial, totora, termitas.

ABSTRACT

Probiotic bacteria are currently a great support for animal husbandry, but their availability is not very commercially abundant, but exists in different habitats in nature, such as in the gut of termites. These have the ability to improve animal health, help them gain weight and provide additional immune defense. The research was conducted in the laboratory of the Reference Center for Sexually Transmitted Infections and in the Microbiology and Biochemistry Laboratories at the Faculty of Biological Sciences of the National University of the Altiplano - Puno from April to June 2017. The objectives of this research were: a) to isolate bacteria from the termite intestine with cellulolytic capacity and to identify those that produce the largest cellulose hydrolysis halos, b) to evaluate the in vitro probiotic characteristics of the cellulolytic bacteria, by tolerance to temperature, bile salts, sodium chloride (NaCl), pH and antagonism tests and c) to determine the potential of cellulolytic bacteria by means of degradation times of the reed (*Schoenoplectus tatora*) under controlled conditions. The bacteria were isolated from the termite gut (*Nasutitermes longinasus*) using the Luria Bertani culture medium incorporated with 1% Carboxymethylcellulose (CMC) and 2% w / v, after which 4 bacteria were selected with more efficiency to hydrolyze the cellulose, which were *Escherichia* spp. (BC3), *Micrococcus* spp. (BDC4), *Enterobacter* spp. (BDC10) and *Micrococcus* spp. (BDC11). These were then subjected to probiotic tolerance tests at different levels of temperature, bile salts, sodium chloride, pH and antagonism tests, all with an initial inoculum of 1.5×10^8 CFU / ml, in which the bacteria *Enterobacter* spp. (BDC10) and *Micrococcus* spp. (BDC11) were the ones that had the best yield increasing their population density of 10^8 to 10^9 UFC / ml, proving to be bacteria with probiotic characteristics. In the degradation tests of the totora, the bacteria BC3 (0.49 g / l) and BDC10 (0.39 g / l) were better in releasing reducing sugars in the time of 72 hours. In the digestibility test, bacteria BC3 (24%) and BDC11 (23.5%) were the most efficient digestible bacteria, but these did not show statistical difference with BDC10 bacteria (19%).

Key Words: Cellulolytic bacteria, probiotic bacteria, potential, totora, termites.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú la ganadería y crianza de animales es una de las actividades más desarrolladas. La Región Puno es una de las primeras en producción vacuna, ovina y camélida del Perú, donde el 80% de la población puneña se dedica a la producción de leche y sus derivados, carne, fibra, lana y cueros (Ministerio de Agricultura, 2008).

Es por ello que los ganaderos buscan constantemente mejorar sus productos, incrementando constantemente la calidad de los mismo mediante técnicas de alimentación y suplementación de diversos agentes químicos y biológicos (Urdaneta, 2009); uno de estos alimentos que se usa para la alimentación de ganado vacuno en especial, es la totora (*Schoenoplectus tatora*) considerado como forraje verde, de la cual se utiliza los tallos aéreos de la planta en épocas de escasez de alimento o en forma rutinaria como alimento de volumen para animales menores y algunos rumiantes de la zona como los vacunos, pero cabe mencionar que la cantidad de fósforo de la totora (0.20%), no tiene requerimiento mínimo establecido (0.30%) (Goyzueta *et al.*, 2009), pero si posee la celulosa en la pared celular de sus células como la mayoría de plantas verdes, que es fuente de energía para el animal dependiendo de la manera como este logre degradar dicho carbohidrato.

Los microorganismos encargados de la degradación de la celulosa que es el principal componente de la pared celular de las plantas incluyen bacterias, hongos, actinomicetos, aerobios, anaerobios, mesófilos y termófilos, los cuales cuentan con la maquinaria enzimática necesaria para dicho propósito (Gaitan & Lara, 2007), y estos pueden habitar en diversos ambientes como el suelo o como parte de la microbiota de algunos animales e insectos (Martinez *et al.*, 2009).

En la producción animal se persigue siempre conseguir una buena situación sanitaria y un buen rendimiento en carne, leche y sus derivados, cuero, etc. para obtener resultados económicos rentables, se sabe que hay una relación directa entre el funcionamiento del tracto intestinal y la tasa de crecimiento, índice de conversión y diversas enfermedades, por lo cual se somete a los animales a tratamientos con antibióticos o quimioterapéuticos, capaces de eliminar no solo a los elementos patógenos sino también a la microbiota necesaria para el buen funcionamiento del aparato digestivo, es por ello que la solución más adecuada para asegurar el rendimiento de la alimentación, con la

consecuente ganancia de peso y aumento de la inmunología natural del animal (García *et al.*, 2012).

Es por ello que se decidió aislar las bacterias del intestino de termitas ya que estas son conocidas por ser xilófagas por lo que poseen en su tracto intestinal bacterias que poseen un alto nivel de degradación de la celulosa ya que logran degradar la celulosa de la madera de árboles que es mucho más compleja (Gracia, 2012), que la celulosa de las demás plantas con la que se alimentan los animales de granja como los ovinos, por lo que su aislamiento y evaluación de sus características probióticas tendrán gran importancia, ya que se podría incluir en la dieta de estos animales lo cual mejoraría enormemente la degradación de la celulosa a nivel del rumen o intestino proporcionando así mayor absorción de nutrientes y de moléculas de glucosa como también mejorando el sistema inmunológico del animal al competir estos con patógenos, y dada que en la región Puno es costumbre alimentar a esos animales con totora se usó esta para comprobar el potencial de degradación de celulosa que poseen estas bacterias y de cuanta glucosa puede liberar y que serían asimiladas por el animal.

Por todo lo antes expuesto se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General

Aislar bacterias celulolíticas del intestino de termitas e identificar las que produzcan los mayores halos de hidrólisis de celulosa, para evaluar sus características probióticas *in vitro* y determinar su potencial en la degradación de la totora (*Schoenoplectus tatora*).

Objetivos Específicos

- Aislar bacterias del intestino de termitas con capacidad celulolítica e identificar las que produzcan los mayores halos de hidrólisis de celulosa.
- Evaluar las características probióticas *in vitro* de las bacterias celulolíticas, mediante tolerancia a temperatura, sales biliares, cloruro de sodio, pH y pruebas antagónicas.
- Determinar el potencial de las bacterias celulolíticas mediante tiempos de degradación de la totora (*Schoenoplectus tatora*) en condiciones controladas.

Hipótesis

Las bacterias aisladas del intestino de las termitas presentan características probióticas y son eficientes en la liberación de azúcares reductores y en la degradación de la celulosa presente en la pared celular de la totora (*Schoenoplectus tatora*).

- Ha: Las bacterias celulolíticas del intestino de termitas presentan características probióticas y capacidad de degradar la celulosa de la totora (*Schoenoplectus tatora*).

- Ho: Las bacterias celulolíticas del intestino de termitas no presentan características probióticas ni la capacidad de degradar la celulosa de la totora (*Schoenoplectus tatora*).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

Viteri *et al.* (2015); reportaron que en las composteras el número de UFC g^{-1} oscilaba entre 10^3 y 7×10^3 , en los suelos de bosque fluctuaban entre 6 y 6.9×10^3 y finalmente, en los suelos cultivados con cereales, entre 17 y 10^3 , donde la evidencia de la degradación de celulosa de estas bacterias se vio por la formación de halos que fluctuó entre 0.65 (Aislamiento 1) y 0.1 cm (Aislamiento 51), en la cual destacaron los aislamientos 1 (*Bacillus* sp.), 6 (*Erwinia* sp.) y 7 (*Pseudomonas* sp), Grillo *et al.* (2011), mencionan también que la evidencia de degradación del Carboximetilcelulosa se evidenció mediante la formación de halos de degradación por actividad de las enzimas celulolíticas α -(1,4) y/o (1,3)-D- glucanohidrolasa que fue procesada por la cepa, logrando con ella digerir la celulosa de *Medicago sativa*.

Lara y Acosta (2013), reportan que las bacterias que aislaron del intestino de termitas del género *Nasutitermes* especie *nigriceps*, resultaron tener un alto potencial celulolítico donde las bacterias BTN7 y BTN8 fueron las que presentaron los mayores halos de hidrólisis de Carboximetilcelulosa CMC (10, 14 y 12 cm), como también fueron las que mejor pasaron las pruebas probióticas, y tuvieron alta eficiencias en degradar la celulosa del pasto, donde la que tuvo mejor rendimiento fue reportado como *Enterobacter aerogenes*, Martínez *et al.* (2002), afirman que los protozoarios y bacterias intestinales de termitas son a las que se atribuyen la función primordial en la degradación de celulosa y otros polímeros de carbohidratos de los sustratos vegetales, siendo estas primordiales para la sobrevivencia del insecto.

Guerrero (2011); logró aislar cuatro especies de bacterias celulolíticas, las identificó como *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes succinogenes* y *Fibrobacter succinogenes elongata*, demostrando que estas bacterias son capaces de degradar el aserrín, aunque los porcentajes de degradación fueron bajos, la fase de adaptación al caldo de cultivo que uso con aserrín por parte de las bacterias fue inmediata, ya que logró observar la degradación del aserrín en las primeras 6 horas de incubación, pero no fue prolongado durante las siguientes horas; Sánchez *et al.* (2002), también logró aislar bacterias ruminales degradadoras del aserrín, donde mediante la prueba de caracterización metabólica determinó que este cultivo mixto

puede utilizar o fermentar el aserrín, donde la principal bacteria que aisló fue *Bacteroides stercorisy*, un habitante natural del tubo digestivo y excretas de animales.

Quintero *et al.* (2009); reporta que el ultrafiltrado de *Aspergillus niger* tiene efectos prebióticos en la síntesis de proteína, producción de acetato e incrementa la actividad de carboximetilcelulasas en el consorcio de bacterias celulolíticas de origen ruminal, donde encontraron también que extractos solubles de *Aspergillus oryzae* estimulan el crecimiento *in vitro* del hongo anaerobio *Neocallimastix frontalis*, Galindo *et al.* (2008) lograron descubrir también un incremento de las organismos celulolíticos por efecto de la inclusión de *Leucaena leucocephala*, comparado con el tratamiento control que, las mejores respuestas fueron en las relaciones 80:20 y 70:30, no obstante resultado clara la respuesta que se observó con la relación 75:25, siendo incluso superiores al control, los hongos celulolíticos lograron incrementaron su población cuando se incluyó el modulador en todas las variantes empleadas, sin diferencias entre las mismas.

Hernández & Cobos (2001), manifiestan que la digestibilidad *in vitro* de la materia seca mostraba mayor ($P < 0.05$) degradabilidad microbiana con el uso de los inóculos procedentes del apéndice cecal de conejos, no observándose diferencias entre el resto de las fuentes de inóculo, con lo cual pudieron demostrar que existen diferencias en la cantidad de bacterias celulolíticas en las diferentes regiones del colon y ciego analizadas, Galina *et al.* (2009), demostraron que un mejor crecimiento ($P < 0.05$) manifestado en un mayor peso corporal, 169 g en comparación con 129 g/d para los individuos control; los incrementos en la tasa de degradabilidad, en la proteína microbiana y en la digestibilidad de la fibra pudieron explicar los resultados.

Quintero *et al.* (2009), logró producir un ultrafiltrado en *Aspergillus niger* que tuvo efectos prebióticos en la producción de acetato, síntesis de proteínas e incremento la actividad de carboximetilcelulasas en un consorcio de bacterias celulolíticas del tracto gastrointestinal de ganado vacuno, Sanchez *et al.* (2015), lograron oponer también un consorcio bacteriano conformado por 17 cepas de terneros neonatos los cuales manifestaron actividad celulolítica y capacidades probióticas en especial la de atravesar las barreras fisiológicas del tracto digestivo.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. La celulosa

La celulosa es el constituyente carbonado de las plantas superiores y posiblemente el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza (Alexander, 1980), debido a que gran parte de vegetación que pasa a formar parte del suelo es celulósica, la descomposición de este carbohidrato tiene una importancia muy especial en el ciclo biológico del carbono, seguidamente los microorganismos del suelo que realizan la hidrólisis del material vegetal (40-60% de los residuos de plantas) influyen el flujo de energía desde este hasta la formación de CO_2 y su liberación en atmósfera (Alexander, 1980; Alcivar & Vera, 2013); como los hongos y bacterias del suelo son los microorganismos mayormente involucrados en el ciclo del material vegetal, una alteración en el número de estos puede mostrar modificaciones en el contenido de materia orgánica del suelo. Cuando esto se comprueba con diferentes indicadores ecológicos (biomasa y diversidad de especies localizadas) se obtiene la información sobre el estado del suelo y su nivel de productividad (Alcivar & Vera, 2013).

a) Estructura química de la celulosa

Las moléculas de glucosa se unen entre sí a través de los enlaces β -1,4-glucosídico, para así formar cadenas de longitud enorme que dan lugar a las moléculas de celulosa. Las moléculas resultantes de la polimerización de la glucosa, con fórmula empírica $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$, son altamente resistentes e insolubles en agua (Gaitan & Lara, 2007), la celulosa tiene una estructura lineal o fibrosa (Figura 1) donde los diversos puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo, que se establecen entre diferentes cadenas yuxtapuestas de glucosa, dando lugar a fibras de mayores dimensiones llamadas microfibrillas que conforman la pared celular de las células vegetales, donde este representa aproximadamente el 50 por ciento del peso seco las plantas (Gracia, 2012).

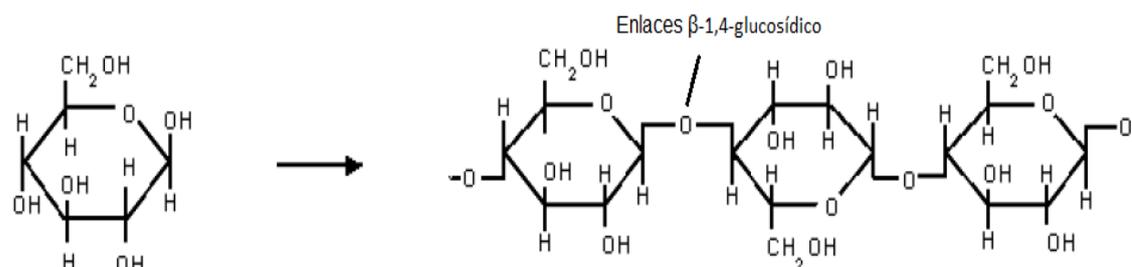


Figura 1. Estructura química de la celulosa (Gracia, 2012).

Una importante característica inusual de la celulosa es su estructura cristalina (Figura 2), sin embargo, las fibras individuales no son puramente cristalinas, lo que genera regiones amorfas donde las fibras contienen torceduras y espacios en sus microfibrillas lo cual permite la conformación de microporos y capilares lo suficientemente amplios para permitir la entrada de moléculas relativamente más grandes incluyendo en algunos casos enzimas celulolíticas (Guerrero, 2011), las microfibrillas de celulosa están estabilizadas por los enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares y rodeadas por polisacáridos hemicelulósicos (manano y xilano) que se unen a la celulosa por los enlaces covalentes y puentes de hidrógeno, los cuales la hacen extremadamente fuerte y resistente a la hidrólisis química y biológica, así mismo, las regiones amorfas de la estructura cristalina de la celulosa tienen composición diversa que se caracteriza por una amplia gama de enlaces, donde este intercambio asimétrico es una característica de las regiones amorfas esencial para la biodegradación de la celulosa (Gaitan & Lara, 2007).

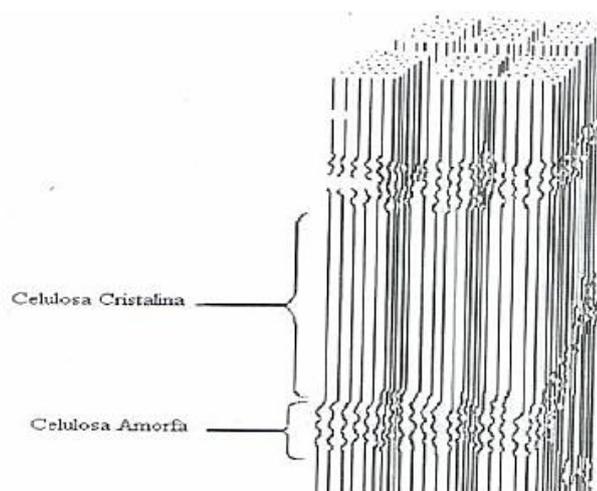


Figura 2. Regiones cristalinas y amorfas en la estructura de la celulosa (Gaitan & Lara, 2007).

b) Degradación de la celulosa

1. Enzimas degradadoras de celulosa

En la hidrólisis de la celulosa es indispensable la presencia de enzimas, siendo tres las más destacadas: la exo β -1,4 celobiohidrolasa, endo β -1,4 glucanasa (β -1,4 glucano glucanohidrolasa) y la β -1,4 glucosidasa (Zhang *et al.*, 2006), donde la endo β -1,4 glucanasa hidroliza aleatoriamente los enlaces β -1,4 glucosídicos intramoleculares expuestos de cadenas de celulosa para producir con ello oligosacáridos de diversas longitudes (celodextrinas), la exo β -1,4 celobiohidrolasa cliva los extremos no

reductores del sustrato produciendo unidades de celobiosa o glucosa y por último la β -1,4 glucosidasa, termina el proceso hidrolítico transformando los fragmentos de celobiosa a glucosa o quitando glucosa desde los extremos no reductores de diminutos celoligosacáridos (Gaitan & Lara, 2007).

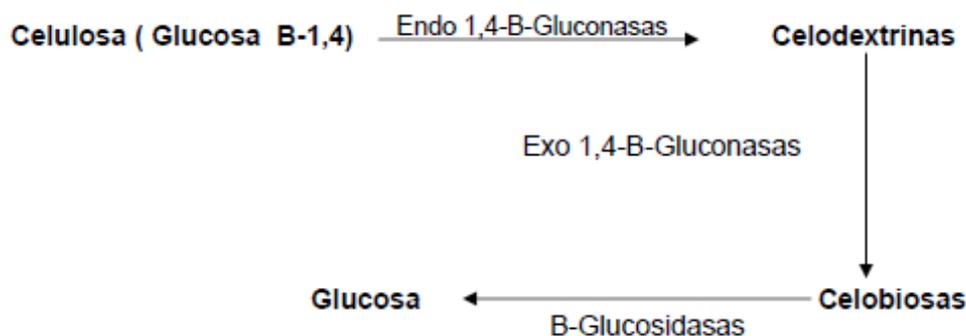


Figura 3. Proceso de degradación enzimática de la celulosa (Lara, 2005).

2. Microorganismos celulolíticos

Todos los organismos capaces de la degradación de la celulosa cristalina secretan un conglomerado de celulasas con diferentes niveles de especificidad y modo de acción, que actúan sinérgicamente para hidrolizar a la celulosa (Gaitan & Lara, 2007), dicho grupo se ha venido nominando sistema o complejo celulasa, esta nominación es confusa ya que sólo en algunas bacterias anaerobias las enzimas celulolíticas se juntan en complejos multienzimáticos extracelulares (Macarron, 1992).

Los microorganismos degradadores de celulosa incluyen bacterias y hongos, aerobios y anaerobios, termófilos y mesófilos que ocupan diversos hábitats; entre los hongos celulolíticos se destacan: *Phanerochaete chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium funiculosum*, *Sporotrix sp.*, *Helotium sp.*, *Alternaria sp.*, *Geotrichum sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Trametes sp.*, *Paecilomyces sp.*, *Mucor sp.*, *Cladosporium sp.*, *Bulgaria sp.*, *Chaetomium sp.*, *Aspergillus sp.* (Martínez et al., 2016), entre las bacterias más diversas y conocidas son las aerobias dentro de las cuales se pueden citar: *Cytophaga sp.*, *Vibrio sp.*, *Bacillus sp.*, *Cellulomonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Thermobifida sp.* Además se encuentran algunos anaerobios como: *Acetivibrio cellulolyticus*, *Thermo monospora sp.*, *Butiri vibrio sp.*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Bacteroides succinogenes*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus salbus*, *Coryne bacterium sp.*, *Tuminococcus flavefaciens* (Gaitan & Lara, 2007).

3. Actividad enzimática de los microorganismos en la degradación de la celulosa

La acción enzimática es el factor más importante en el proceso de degradación de celulosa donde los microorganismos tienen la capacidad de sintetizar exoenzimas (celulasas), que van a actuar sobre la celulosa con lo cual la hidrolizarán en productos que puedan ser usados como fuente de energía y carbono (Barrera *et al.*, 2009), estas enzimas confieren la posibilidad de degradar las fibras de celulosa principalmente por dos sistemas enzimáticos llamados agregativos y no agregativos (Marín, 2007), los sistemas agregativos se manifiestan en las bacterias anaerobias y es llamado como celulosoma, el que funciona como estructuras exocelulares especializadas las cuales catalizan la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa, y está compuesto de por lo menos de 14 polipéptidos distintos, incluyendo diversas celulasas, xilanasas y por lo menos una β -glucosidasa. Los sistemas no agregativos a su vez funcionan en presencia de oxígeno y están compuestos principalmente por tres tipos de enzimas: endo- β -1,4-glucanasa que tiene acción sobre los enlaces β -1,4 en las regiones amorfas internas de la macromolécula, resultando largos fragmentos solubles (oligosacáridos), la exo- β -1,4-glucanasa, que permite dividir el disacárido celobiosa desde los extremos de la molécula y la β -glucosidasa que hidroliza a la celobiosa para la formación de la glucosa (Sandoval, 2011).

4. Factores que determinan la actividad enzimática de las celulasas

Hay evidencia de que diversos factores se encuentran asociados a los sistemas enzimáticos de las celulasas (Alexander, 1980), que ha sido relacionados por influenciar en los procesos hidrolíticos, como por ejemplo: inhibición del complejo de celulasas por el producto final, inactivación térmica, sinergismo e irreversible adsorción enzimática, teniendo estos últimos mayor influencia en el proceso de degradación del polisacárido (Gaitan & Lara, 2007).

– Sinergismo

El sinergismo sucede cuando la acción combinada de dos o más enzimas incrementa la tasa de acción sobre el sustrato respecto a la acción individual (Bhat, 2000), se han

hecho estudios en los que se observó una actividad cooperada de las celulasas de *Trichoderma reesei* en la que las endonucleasas actúan al azar a lo largo de las cadenas de celulosa produciendo sitios donde tienen actividad las exoglucanasas las cuales liberan celobiosa como producto principal, una tercera enzima, la β -glucosidasa se requiere para hidrolizar la celobiosa previniendo de esta manera la inhibición de las exoglucanasas por conglomeramiento de producto y por lo tanto generando un aumento en la tasa de hidrólisis (Mansfield *et al.*, 1999).

- **Absorción**

La hidrólisis de la celulosa se diferencia de otras reacciones enzimáticas en que el sustrato es insoluble y precisa una previa absorción de la enzima al sustrato (Macarron, 1992), la absorción de las celulasas es facilitada por la presencia de dominios en el sustrato los cuales son aptos para el clivaje proteolítico mediante uniones por fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno, además estos dominios cuentan con aminoácidos aromáticos que les confieren una especificidad extra y estabilidad al complejo enzima – sustrato, donde hay dos teorías que pueden explicar la interacción de dominios con la celulosa. La primera se sustenta en que los dominios aumentan la concentración local de enzimas en la superficie de la celulosa, la segunda propone que los dominios son un instrumento que le permite el rompimiento de cadenas de celulosa cristalina pero no de celulosa amorfa (Mansfield *et al.*, 1999).

c) **Usos de las enzimas degradadoras de celulosa y su utilidad industrial**

Las celulasas y enzimas relacionadas son usadas en industrias alimenticias de vino, alimentación animal, de cervecería, de detergentes, del papel, textil, así como también en la investigación y agricultura (Marín, 2007), esta ampliada gama de aplicaciones hacen a estas enzimas muy atractivas y demuestran su inmenso valor comercial en la industria biotecnológica (Bhat, 2000).

Las celulasas poseen diversas funciones en la industria alimentaria, entre las cuales se destacan la habilidad de hidrolizar los componentes de las paredes celulares, con lo que se disminuye la viscosidad y se mantiene la textura en los jugos de frutas. Además liberan antioxidantes de la fruta, lo que ayuda a controlar algunas enfermedades coronarias. Así mismo, se utilizan celulasas del tipo endoglucanasas junto con xilanasas

para la separación de almidón y gluten de la harina, gracias a la hidrólisis del almidón y arabinosilano (Bhat, 2000), en la industria del papel, que alcanza las mayores ventas produciendo así millones de dólares, en Europa y Estados Unidos, las hemicelulasas y celulasas usadas en etapas de pretratamiento, permiten una mejor deslignificación y ahorro en reactivos químicos en la etapa posterior de blanqueamiento. Las celulasas también mejoran la remoción de tintas de papeles de diario antiguos, dando mejores resultados que cuando se utilizan productos químicos, por otro lado la industria del textil, se ha convertido en los últimos 14 años en una de las principales áreas para las aplicaciones industriales de estas enzimas. Las celulasas representan el mayor grupo de enzimas en esta industria, considerando el hecho de que cerca del 70 % de las fibras procesadas por esta industria son de celulosa. Entre las aplicaciones más sobresaliente en esta área son: tratamiento de las telas para eliminar imperfecciones de las fibras, distinción de prendas para dar apariencia de gastado, preparación de la tela previa a tintaciones o impresiones para obtener mayor afinidad con los pigmentos y desfibrilación realizada antes y después del teñido (Marín, 2007).

En la industria del vino y de la cerveza, las celulasas tienen atractivas y diversas aplicaciones, una de ellas es en el proceso de producción de la cerveza, en donde las celulasas del tipo endoglucanasa se utilizan para la hidrólisis del enlace 1,4- β -glucosídicos de las semillas de cebada, lo que disminuye la viscosidad y libera azúcares reducidos durante la primera fermentación, con esto se obtiene un incremento de eficiencia en dicha etapa, y en la etapa de filtración, y un aumento en la calidad de la cerveza (Bhat, 2000), como en la industria del vino, celulasas del tipo β -glucosidasa son utilizadas para el mejoramiento de la fragancia del vino, así mismo el uso de endoglucanasas es conocido para el mejoramiento de las etapas de maceración, clarificación y filtración, así como también para a la obtención de un vino de alta calidad y estabilidad (Sandoval, 2011).

El coste de producción de las enzimas celulolíticas, suponen una importante partida de los costes del proceso de sacarificación de residuos lignocelulósicos (Figura 4), por lo que avanzar en el conocimiento de las celulasas, de su biosíntesis, propiedades y mecanismo de acción, seleccionar buenos productores y buenas técnicas de producción (Grillo *et al.*, 2011), ha abaratado esta biotecnología hasta hacerla casi competitiva con

otras tecnologías empleadas en la producción de azúcares (fundamentalmente la hidrólisis de almidones) (Macarron, 1992).

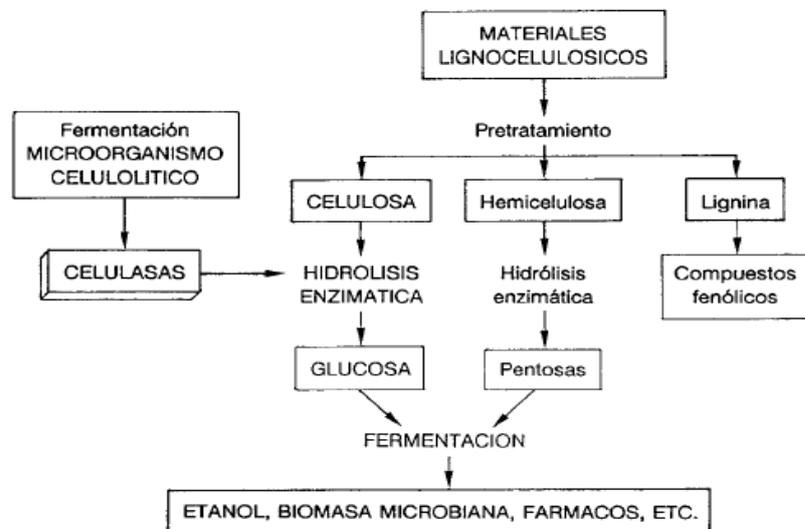


Figura 4. Esquema del proceso de sacarificación de residuos lignocelulósicos (Macarron, 1992).

2.2.2. Termitas

Las termitas son insectos pertenecientes al Orden Isoptera, los cuales son sociales que conforman alrededor de 3100 especies alrededor de todo el mundo, son xilófagos (se alimentan de madera), constituyendo la celulosa su alimento primordial (Ramirez & Lanfranco, 2001), son insectos polimórficos, exopterigotas, eusociales, que viven en unidades (termiteros) compuestas por una cantidad limitada de individuos sexualmente activos asociados con varios individuos estériles que son las obreras y los soldados cada uno de estos es denominado castas, que a diferencia de los Formicoidea (hormigas verdaderas) pueden ser tanto hembras como machos; todos tienen el cuerpo blando y su tamaño varía entre 2,5 y 18 mm. Dentro de estas son cuatro castas que con diferentes especializaciones: los reproductores primarios, los reproductores suplementarios conocidos también como neoténicos, los soldados y las obreras (Gaju *et al.*, 2015).

a) Biología

El ciclo de vida de las termitas inicia con el vuelo nupcial, en el momento en que una de las colonias maduras envía los machos y hembras reproductores a que se apareen (Pennisi, 2015), luego de realizar la fertilización, ambas termitas pierden sus alas y conforman nuevas colonias, convirtiéndose así en la reina y el rey del nuevo termitero,

tienen metamorfosis incompleta, ya que pasan por los estadios de huevo, ninfa y adultos (rey, reina, obreras y soldados) (ControlSAC, 2015).

Durante la época reproductiva, a principios de la estación lluviosa, machos y hembras reproductivas cambian de color de un rosado pálido o crema a un café oscuro, desarrollan dos pares de alas y emergen de sus galerías en busca de un sitio donde establecer una nueva colonia (ControlSAC, 2015), en donde se desplazan en grupos, pero la pareja (macho y hembra) son los que se establecen en el nuevo sitio, generalmente una pieza de madera, dependiendo de la especie, pueden tomar hasta tres años para desarrollar una colonia y durante todo este tiempo, no muestran indicios de su presencia, es por esto que es tan difícil su detección, más cuando uno observar unas esferas finas que son los desperdicios fecales del comején, ya han establecido plenamente su colonia (Canessa, 2006).

Los individuos de la colonia nunca abandonan sus galerías, las cuales, penetran profundamente en la madera, así que no se puede esperar verlas, a menos que se corte la pieza (Grassé, 1982), lo que hacen es que perforan la salida a la superficie de las piezas para limpiar su galería y botar los desechos fecales y una vez cumplida su tarea, tapan el huequecillo de salida con una mezcla de madera molida y secreciones salivales, de manera que es muy difícil poder ver de donde están cayendo los desechos (Canessa, 2006).

Las castas de los termiteros son muy importantes para el desarrollo correcto de toda la colonia de termitas por lo que la casta de cada individuo es determinada por los requerimientos de la sociedad, por medio de hormonas y feromonas, secretadas principalmente por los individuos reproductores, actuando sobre las ninfas (concepto llamado presión social) (Pennisi, 2015), en cada una de las castas hay individuos de ambos sexos (a pesar que no pueden reproducirse entre sí, excluyendo la casta de los reproductores), lo que es una diferencia con las hormigas, en que las castas de obrero y soldado consisten básicamente de hembras, donde por lo general la casta más abundante en los termiteros es la casta de los obreros, que es la que en definitiva produce el daño a la madera (ControlSAC, 2015), además de la utilización para determinar la casta a la que pertenecerá cada individuo, las feromonas y hormonas que las termitas producen les permiten comunicarse, reconocerse entre los individuos de una misma colonia, y

también como señal de aviso frente a algún tipo de predador, todo lo cual les permite organizar y mantener su sociedad (Ramirez & Lanfranco, 2001).

b) Ciclo de desarrollo

Pasan por tres estadios distintos: el de huevo, ninfa y adulto los cuales luego se diferencian en las diferentes castas de la colonia (ControlSAC, 2015).

Huevos

Los huevos son diminutos, translúcidos y de color blanco (Pennisi, 2015; Canessa, 2006), son muy difíciles de encontrar, a menudo se encuentran enterrados dentro de las paredes o de las profundidades de la colonia, dentro de un espacio de tiempo de dos a cinco años, mientras la colonia madura, la capacidad de puesta y de producción de huevos de la reina incrementa, la reina se convierte en una “máquina ponedora de huevos” y puede producir hasta 36000 huevos al día durante muchos años, pero en las regiones templadas o en las épocas de invierno es donde la producción de huevo se ralentiza o detiene, mientras que en las especies tropicales continúa a lo largo del año (ControlSAC, 2015).

Ninfas

El desarrollo post-embionario de los isópteros es muy complejo debido a las diferentes castas (Grassé, 1982), ya que dependiendo del grupo de termes, las formas inmaduras pueden transformarse en cualquier casta de la colonia o tener el destino predeterminado y, una vez iniciada una línea en una casta, ya no pueden modificarse, dependiendo del grupo de termes, el primer o los dos primeros estadios, reciben la denominación de “larvas” debido a que su destino de casta aún no está fijado, pudiéndose derivar a casta casta estéril (obrero o soldado) o reproductora (ninfas), la casta de reproductora primaria procede de ninfas que desarrollan esbozos de alas como en otros órdenes de insectos paurometábolos (Gaju *et al.*, 2015).

Aunque la denominación de larva es típica de insectos holometábolos, los especialistas en termes la utilizan porque el neonato (larva 1 - L1) o el estadio siguiente (larva 2 – L2), no presentan esbozos de alas y se reserva la denominación de ninfa para los estadios que sí presentan dichos esbozos, terminando su desarrollo con el imago alado (Gaju *et al.*, 2015), el número de estadios ninfales en isópteros es variable, se han

descrito doce en *Mastotermes*, cinco en *Nasutitermes*, siete en *Reticulitermes* y *Kalotermes*, donde las formas juveniles de los isópteros, por su modo de vida oculto, en ausencia de luz, tienen el cuerpo despigmentado y carecen de ojos; los esbozos de alas aparecen y van incrementando su tamaño progresivamente tras cada muda, al aproximarse la muda imaginal, en el último estadio ninfal aparecen los esbozos de ojos (Syaukani & Thompson, 2011), el desarrollo de la línea imaginal en *Reticulitermes* ha sido estudiado ampliamente; inicialmente se consideró que constaba de ocho estadios antes del imago dos larvas L1, L2 y seis ninfas de N3 a N8, no obstante estudios recientes consideran que la ninfa 6, puede dar lugar a dos tipos de ninfas: una con esbozos de alas cortos (NEAC) y otra con esbozos de alas largos (NEAL), la primera dará lugar a neoténicos braquípteros y la segunda a los imagos (Grassé, 1982).

Adultos (Diferenciación en castas)

– Obreras

Las obreras miden de 3 a 5 mm (Grassé, 1982), son de color blanquecino, lo que hace que a simple vista muchas personas las confundan con gusanillos blancos. Su función, dentro de la colonia, es detectar el alimento y distribuirlo al resto de la colonia (son las que causan los daños en la madera); también construyen y mantienen la estructura del termitero y cuidan los huevos y larvas (ControlSAC, 2015).

– Soldados

Los soldados presentan un aspecto muy parecido a las obreras (Pennisi, 2015), pero su cabeza es más grande y sus mandíbulas están mucho más desarrolladas para la función de defensa de la colonia, estos no tienen la capacidad de alimentarse por sí solos, por lo que requieren de las obreras para recibir su alimento (ControlSAC, 2015).

– Reproductores o imagos

Se denomina comúnmente como la reina y el rey, son esclerotizados, macrópteros que se despojan de sus alas al formar nuevas colonias, aun conservando restos de las mismas en forma de pequeñas escamas alares de forma triangular, mantienen la esclerotización, son los únicos sexuales imaginales y los que procrean a las demás castas del termitero, estos se diferencian de ninfas, con un parecido a las obreras, que se les distinguen los esbozos de las alas del tórax (Gaju *et al.*, 2015), por lo general viven al interior del termitero con una movilidad muy limitada, por lo que requieren de otros

miembros de la colonia para su alimentación. Los que más sorprende de estas es la esperanza de vida que tienen, entre 20 y 25 años. Su función principal es reproductiva, fundamental para lograr mantener y aumentar la población de la colonia (ControlSAC, 2015).

c) Alimentación

El alimento principal de las termitas es la celulosa (Grassé, 1982), debido a que este no puede ser digerido y utilizado directamente por el insecto para su desarrollo, en su tubo digestivo presenta una simbiosis, ya sea con protozoos flagelados o con bacterias, dependiendo de la especie de termita (Gaju *et al.*, 2002; Syaukani & Thompson, 2011; Lara & Acosta, 2013), donde son estos simbiosis, quienes se encargan de realizar la digestibilidad de la madera, produciendo de esta manera el alimento proctodeal, el cual es excretado por el ano, al igual que las deposiciones, a pesar de lo cual no deben ser confundidas entre sí. El alimento proctodeal, además de constituir el alimento para toda la colonia, entregan simbiosis necesarios para las generaciones más jóvenes, las que nacen sin ellos, sin esta simbiosis, los insectos morirían de inanición irremediablemente, aunque sigan alimentándose (Grassé, 1982); otro tipo de alimento es el estomodeal, producido por las glándulas salivales del insecto, donde el alimento es producido por las obreras, las cuales, mediante el vómito (alimento estomodeal) y secreción (alimento proctodeal), realizan el abastecimiento de la colonia, el traspaso de comida entre los individuos se realiza de boca a boca, proceso llamado trofalaxia, y son las obreras las que abastecen tanto a las ninfas en desarrollo como a la casta reproductora y soldados; en falta de alimento suelen convertirse caníbales (consumiendo a individuos enfermos o heridos), necrófagos (alimentándose de individuos muertos) y oófagos (alimentándose de huevos), lo cual les sirve como una fuente extra y alterna de alimento, lo cual les permiten mantener el termitero sano y limpio (Ramírez & Lanfranco, 2001).

d) Microbiota intestinal de las termitas

A pesar de su pequeño tamaño, el intestino de las termitas inferiores constituye un biotipo altamente complejo (Grassé, 1982), ya que su contenido está compuesto de un líquido espeso donde habitan espiroquetas, zooflagelados, bacilos del tipo *Flexilis* y los restos de madera que llegan, sin deformarse, después de haber atravesado el intestino

medio, con la cual las termitas realizan la degradación de celulosa (Martinez *et al.*, 2009).

El papel de los microorganismos de las termitas en la digestión de la lignocelulosa es hidrolizar sus componentes por las enzimas que producen (Lara & Acosta, 2013), aparte de ello las termitas tienen protozoarios (*Tricercomitis*, *Trichomitopsis termopsidis*, *Hexamastix termopsidis*) que sobreviven en base de celulosa, llegando a formar parte del peso total del insecto ocupando la tercera parte de este, los cuales presentan los 3 tipos de bacterias que utilizan el hidrógeno: acetogénicas (*Nasutitermes nigricep*, *Sporumusa termitida*, *Acetonema longum*, etc), metanogénicas (*Zootermopsis angustiollis*), y sulfato reductoras (*Desulfovibrio giganteus* entre otros) (Ibarra, 2006), por ejemplo, entre las bacterias que predominan en *Coptotermes lacteus* son las que pertenecen a los géneros *Enterobacter* y *Streptococcus*, por otro lado en *Nasutitermes exitiosus*, es una especie sin zooflagelados, los *Streptococcus* son los más abundantes sobre todas las demás bacterias (Grassé, 1982).

e) Influencia de las termitas en la sociedad

Los termites son objeto de diversos estudios, no sólo en su vertiente científica al ser insectos primitivos estrechamente relacionados con los Blattodea, por ello, de interés en filogenia, sino mayormente por las especies que causan perjuicio a los cultivos, bienes muebles e inmuebles de los seres humanos (ControlSAC, 2015), estos son los causantes de la gran cantidad de daños en postes, árboles, cultivos, casas, obras de arte, muebles, etc. un estimado del coste global de los daños es complejo, porque al coste de eliminar las plagas, hay que añadir los costes de rehabilitación de los daños causados, donde dos ejemplos de estimación del daño que indican para 2010 un coste global de 40 millones de dólares, otro dato es de un calculado un coste de 200 millones de euros sólo para Francia; al vivir en nidos o galerías es difícil poder detectarlos y sólo se puede afirmar que existe una colonia cuando hay un enjambrazón o vuelo nupcial o cuando, al hacer pequeños orificios para conservar las condiciones ambientales en el nido para lo cual construyen vías externas con tierra mezclada con excrementos (tubos de barro) (Gaju *et al.*, 2015).

En sus nidos, los termites pueden convivir con una gran cantidad de fauna de insectos y otros artrópodos, son los termitófilos (Ramirez & Lanfranco, 2001), donde algunos son

depredadores de huevos o parásitos, otros sólo se alimentan de residuos del nido, pero hay algunos que tienen una estrecha relación con los termes y producen una secreción que les estimula y por medio de la cual son alimentados por ellos (Gaju *et al.*, 2015).

2.2.3. Probióticos

El término probiótico significa “a favor de la vida” y en la actualidad se utiliza para designar a las bacterias que tienen efectos benéficos para los seres humanos y los animales (García, 2010), la observación original de la funcionalidad positiva desempeñada por algunas bacterias es atribuida a Eli Metchnikoff, ruso galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur a comienzos del siglo pasado, quien afirmó que "la dependencia de los microbios del intestino con respecto a los alimentos hace que sea posible implementar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles" (FAO & OMS, 2006).

Como microorganismos probióticos se utilizan sobre todo, aunque no exclusivamente, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y el número de alimentos con probióticos ya son puestos a disposición de los consumidores cada vez más en mayor concentración (García *et al.*, 2012), por lo que comprender la importancia del concepto de alimento probiótico para la salud humana es importante y necesario algunas consideraciones ecológicas acerca de la flora intestinal; las bacterias habitan normalmente en el cuerpo humano (así como en el de los animales superiores y los insectos), incluido el aparato digestivo, donde habitan más de 400 especies de estas bacterias: más de la mitad del peso de la materia que se encuentra en el colon corresponde a células bacterianas cuya cantidad es diez veces superior al de las células de los tejidos que constituyen el cuerpo humano, mientras que el estómago contiene normalmente pocas bacterias (103 unidades formadoras de colonias por ml de jugo gástrico), mientras que la concentración bacteriana incrementa a lo largo del intestino hasta llegar a una concentración final aproximada en el colon de 10¹² bacterias/g, donde la colonización bacteriana del intestino comienza con el nacimiento, ya que los recién nacidos permanecen en un ambiente estéril hasta que inicia el parto, y continúa durante toda la vida, con cambios notables en función de la edad. Las bacterias, que forman la denominada microbiota intestinal residente, no suelen tener efectos negativos

o nocivos agudos, y se ha demostrado que algunas de ellas son indispensables para mantener el bienestar de su hospedador (FAO & OMS, 2006).

a) Beneficios de los probióticos y mecanismos de acción

La intención de usar probióticos es que favorezcan positivamente a la flora intestinal que aparece naturalmente en el organismo humano (FAO & OMS, 2006). Algunos preparados probióticos han sido usados para evitar la disentería provocada por antibióticos o como parte del tratamiento de enfermedades como la disbiosis vinculada a los antibióticos, existen estudios que han reportado los efectos de los probióticos en una serie de trastornos extraintestinales y gastrointestinales, entre los que se está incluida la enfermedad intestinal inflamatoria, las infecciones vaginales, el síndrome de intestino irritable, y como refuerzo inmunológico, algunos probióticos han sido útiles aumentando la sobrevivencia de los recién nacidos. Los probióticos son investigados y relacionados con el eczema atópico y complicaciones en cirrosis hepática. Existen evidencias clínicas sobre el papel de los probióticos para disminuir el colesterol, de los cuales los resultados son contradictorios. En general, la mayor evidencia en salud para los probióticos está relacionada a su uso para el mejoramiento del bienestar intestinal y la incrementación de la función inmunitaria (World Gastroenterology Organisation, 2011).

Como ejemplo se puede mencionar a *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus vulgaris*, que contribuyen al crecimiento de bacterias resistentes como *Lactobacillus acidophilus* (World Gastroenterology Organisation, 2011), esta bacteria desdobla la lactosa para producir ácido láctico; es considerado como probiótico porque produce peróxido de hidrógeno que es un inhibidor de microbios indeseables, igualmente ayuda a evitar desórdenes intestinales tipo constipación y flatulencia, otro ejemplo de probióticos benéficos son las *Bifidobacterias* que sintetizan vitaminas implicadas en importantes funciones metabólicas y que se absorben lentamente tales como las vitaminas B6 y K, Tiamina, Riboflavina; como también puede sintetizar aminoácidos (Lara, 2005).

– Estimulación de la respuesta inmune

Las últimas investigaciones sugieren que la estimulación de la inmunidad adquirida y la innata nos protege contra la enfermedad intestinal, en donde estos microorganismos

pueden mandar señales de alarma al sistema inmune y favorecer el rechazo de agentes infecciosos estimulando la producción de inmunoglobulina A (IgA), activando a los macrófagos e incrementando interferón gamma (IFN-gamma) y citoquinas proinflamatorias (Castro & Rovetto, 2006), por igual estudios recientes han encontrado que *Lactobacillus* administrados por vía oral estimula la actividad de los macrófagos, contra distintas especies bacterianas, como *Lactobacillus casei* que estimula los mecanismos de producción de Gammaglobulinas tipo A (Lara, 2005).

– Producción de antimicrobianos

En este grupo se tienen los ácidos orgánicos que producen una disminución en el pH proporcionando así un ambiente poco apropiado para el crecimiento y desarrollo de patógenos. Como ejemplo se puede mencionar el caso de las *Bifidobacterias* (FAO & OMS, 2006), que pueden producir ácido acético, láctico y mínimas cantidades de ácido fórmico a partir del catabolismo de los carbohidratos, el lactato y el acetato eliminan microorganismos como *Salmonella spp*, *Candida spp*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringes*, productores de toxinas y diversos problemas entéricos (Lara, 2005), por lo que en la industria alimenticia las BAL (Bacilos Acido Lácticos) son utilizadas como conservadores biológicos porque producen bacteriocinas que ejercen una acción antibacteriana y contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos (Castro & Rovetto, 2006).

– Competencia por la adhesión con patógenos a los receptores

Se sabe que los patógenos procedentes del agua o de los alimentos tienen la capacidad de adherirse a las paredes del intestino y colonizar produciendo así enfermedades, mientras que el uso de antibióticos provoca la muerte de una gran parte de la microbiota intestinal dejando vía libre para que los patógenos resistentes se adhieran y proliferen en los espacios antes ocupados por los microbios benéficos del intestino, igualmente en períodos de estrés se producen un aumento de adrenalina y corticosteroides, lo que daña la homeostasis intestinal ejerciendo un efecto debilitador sobre la salud, ocasionando así vulnerabilidad a cualquier infección y permitiendo el ingreso de microorganismos patógenos invasores, problema que se puede solucionar con el consumo o suministro de probióticos (Lara, 2005), es por ello que al poseer la característica de adherirse a la pared epitelial del intestino, ocupando “nichos ecológicos” y actuando como una barrera de protección ante la colonización de patógenos nos brindan inmunidad; algunas cepas

han sido ya identificadas por su habilidad de adherencia a las células epiteliales como *Lactobacillus* spp (Castro & Rovetto, 2006).

– Competencia por Nutrientes

El intestino cumple funciones de absorción de nutrientes (Romeu, 2012), por lo que en el lumen intestinal abundan los nutrientes procedentes del proceso de digestión, sin embargo los microorganismos compiten por determinadas sustancias que favorecen su crecimiento y desarrollo (Lara, 2005).

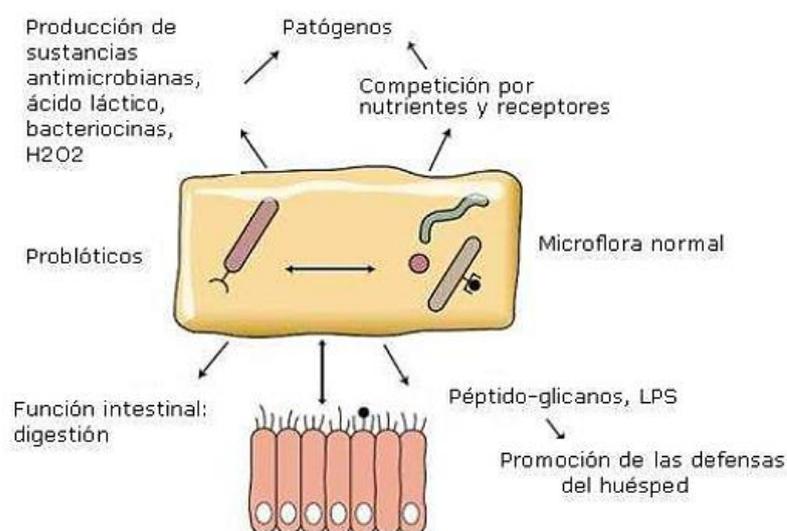


Figura 5. Mecanismos de acción de los probióticos (World Gastroenterology Organisation, 2011).

b) Microorganismos probióticos

Existen en la actualidad diversa cantidad de microorganismos (Tabla 2) ya estudiados como algunos de los Bacilos Acido Lácticas, que poseen características probióticas (Lara, 2005), estos se encuentran seguidamente en productos lácticos, los cuales están identificados por su género, especie, y una designación alfa numérica en donde la comunidad científica ha acordado una nomenclatura para los microorganismos como se muestra en la Tabla 1 y 2, pero a pesar de ello la comercialización y los nombres comerciales no están regulados, y las compañías pueden ponerle el nombre que quieran a sus productos probióticos (World Gastroenterology Organisation, 2011).

Tabla 1. Nomenclatura para los microorganismos probióticos.

Género	Especie	Designación de la cepa
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	GG
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	DN-114 001

Fuente: World Gastroenterology Organisation (2011).

Tabla 2. Microorganismos probióticos de casas comerciales.

Cepa (designaciones alternativas)	Nombre de marca	Fabricante
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173 010	Activia	Danone/Dannon
<i>Bifidobacterium animalis</i> subesp. <i>lactis</i> Bb-12	Chi. Hansen	
<i>Bifidobacterium breve</i> Yakult	Bifiene	Yakult
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	Align	Procter & Gamble
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (DR10)	Howaru Bifido	Danisco
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536		Morinaga Milk Industry
<i>Enterococcus</i> LAB SF 68	Bioflorin	Cerbios-Pharma
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Mutaflor	Ardeypharm
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM		Danisco
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	Actimel, DanActive	Danone/Dannon
<i>Lactobacillus casei</i> CRL431		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus casei</i> F19	Cultura	Arla Foods
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult	Yakult
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 (Lj1)	LC1	Nestlé
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	Norrmejerier	
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V	GoodBelly, ProViva	NextFoods Probi
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	L. reuteri, Protectis	BioGaia

<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53013 (LGG)	Vifit and others	Valio
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21	Verum	Norrmejerier
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118		
<i>Saccharomyces cerevisiae (boulardii)</i> Iyo	DiarSafe, Ultralevure, etc.	Wren Laboratories, Biocodex, etc.
Analizados como mezcla: <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285 y <i>L.casei</i> Lbc80r	Bio K+	Bio K+ International
Analizados como mezcla: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 y <i>L. reuteri</i> RC-14	FemDophilus	Chr. Hansen
Analizados como mezcla: VSL#3 (mezcla de una cepa de <i>Streptococcus thermophilus</i> , cuatro <i>Lactobacillus</i> spp., y tres cepas <i>Bifidobacterium</i> spp.	VSL#3	Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.
Analizados como mezcla: <i>Lactobacillus acidophilus</i> CUL60 y <i>Bifidobacterium bifidum</i> CUL 20		
Analizados como mezcla: <i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 y <i>L. rhamnosus</i> R0011	A'Biotica y otros	Institut Rosell
Analizados como mezcla: <i>Bacillus clausii</i> cepas O/C, NR, SIN y T	Enterogermina	Sanofi-Aventis

Fuente: World Gastroenterology Organisation (2011).

c) Criterios de selección de probióticos

Los microorganismos candidatos para probióticos son generalmente aislados de organismos sanos, del tracto intestinal y urogenital de personas, animales o insectos (García, 2010), estos microbios por lo general logran desarrollarse mejor en pH ácido y son altamente resistentes a la bilis; unos son anoxigénicos y otros anoxigénicos facultativos (Lara, 2005).

Con el fin de evaluar las propiedades de los probióticos, se utilizan las directrices siguientes: Los microorganismos probióticos que serán utilizados en alimentos tienen que ser capaces de lograr sobrevivir las barreras del tracto digestivo, también llegan a multiplicarse en el lugar donde se establezcan, esto significa que deberían ser resistentes a los jugos gástricos y poder crecer en presencia de sales biliares, en las condiciones existentes en los intestinos, o ser consumidos en alimentos los cuales actúan como

vehículo, lo cual les permita sobrevivir al paso por el estómago y a la exposición a la bilis (FAO & OMS, 2006; World Gastroenterology Organisation, 2011).

2.2.4. La totora (*Schoenoplectus tatora*)

La totora es una "macrófita" que crece fijada al suelo y emerge fuera de la superficie del agua, formando así la vegetación dominante de lagunas y lagos del Altiplano peruano y boliviano, pudiéndose encontrar en algunas zonas asociadas con hinojo llachu (*Myriophyllum melatinoides*), yana llachu (*Elodea potamogeton*), o Chilkallachu (*Potamogeton strictus*), que son también macrófitas pero sumergidas (Collot, 1980), donde la totora constituye un recurso que crece en forma natural en la ribera del lago Titicaca y áreas húmedas aledañas a los principales ríos afluentes y lagunas por debajo de los 4000msnm, este recurso contribuye a la productividad del lago Titicaca, el provee biotipo o hábitat, donde se pueden reproducir muchas especies piscícolas y avícolas. La totora es también importante por ser alimento para animales domésticos utilizándola como forraje los tallos aéreos verdes de las plantas, en épocas de escasez de pasturas, además como materia prima; artesanal autóctono y se ha demostrado que es un recurso óptimo en la elaboración de compost y en la purificación de aguas servidas en plantas de tratamiento (Dejoux & Iltis, 1991).

a) Ubicación sistemática de la totora

El nombre científico de la totora estuvo sujeto a cambios: *Scirpus tatora*, *Scirpus titikakensis*, *Malacochaete tatora*, *Scirpus tatora* Kunt, *Scirpus californicus* (Dejoux & Iltis, 1991), en el año 1980, dos estudios simultáneos sugirieron nombres científicos distintos, el estudio realizado en Bolivia, sugiere la denominación de *Schoenoplectus tatora*, en cambio, el estudio realizado en Perú menciona el género *Scirpus* con dos especies: *Scirpus sp* y *Scirpus tatora*, donde *Scirpus tatora* es una planta de mayor tamaño que crece en aguas profundas como las de la bahía de Puno, en cambio *Scirpus sp.* es de menor tamaño y crece en agua menos profundas, ésta última probablemente sea la anteriormente publicada por Ticona (1980); sin embargo Collot (1980), nos menciona que en la evaluación sobre la composición y distribución de las macrófitas acuáticas en la bahía de Puno reafirman a *Schoenoplectus tatora* como planta emergente de las ciperáceas.

Reino	: Vegetal
División	: Phanerogamae
Sub división	: Angiospermae
Clase	: Monocotiledoneae
Super Orden	: Glumíferas
Orden	: Cyperales
Familia	: Cyperaceae
Género	: <i>Schoenoplectus</i>
Especie	: <i>Schoenoplectus tatora</i>
Nombre Común	: “Totora”

Fuente: Collot., 1980.

– **Número de cromosomas**

Ticona (1980); señala que el número de cromosomas presentes en ésta macrófita oscila entre 23 a 27; y la longitud de los cromosomas es de 13.62, 13.91 a 2.51 – 3.98 nm, esto establecido por la metodología de aplastamiento (squash) de Shimoya, utilizado para el análisis de tejido meristemático.

– **Crecimiento**

Totora verde o tierna

La totora crece entre 2.5 a 4.5 metros por debajo del agua, aunque se encuentra a mayor profundidad (hasta 5.5. metros), como también se le puede encontrar a profundidades mucho menores de 0.7 metros y según otros autores a 0.1 metros cuando el lago llega a su mínimo nivel estacional (Goyzueta, 2005), la totora alcanza su máximo crecimiento en épocas de lluvias (enero, febrero y marzo), época donde la floración es mayor, el corte de la totora se efectúa en cualquier época del año principalmente en los meses de agosto a septiembre, para dar lugar al nuevo crecimiento llamado retoño, esta planta llega a su edad madura a los 4 años, según sea la profundidad de su hábitat; en aguas superficiales a los 2 a 3 años, pero en aguas profundas tarda de 5 a 4 años tal sucede en las regiones del Ramis, Desaguadero y Paucarcolla, (Goyzueta *et al.*, 2009).

Totora amarilla o madura

En el lago Titicaca donde no se percibe un invierno definido, la totora crece todo el año, en temporada de lluvias es más rápido, en donde el crecimiento diario medio suele ser de 1.0 a 0.1 centímetros por tallo, también se observa que el tallo requiere un poco más de un año para alcanzar el tamaño promedio de 3.8 metros, y que el corte mejora el rendimiento de la planta y aumenta la densidad de los totorales (Dejoux & Iltis, 1991), las partes emergidas de la totora están expuestas a la acción desecante del sol y del viento que les hace cambiar de color verde al amarillo en un proceso denominado localmente como maduración, en temporadas de helada la totora cambia a un color gris, lo cual indica fragilidad del tallo (Goyzueta *et al.*, 2009).

c) Composición bioquímica de la totora

La totora en estado fresco es una planta con alta humedad, con 82.8% de agua en su estado tierno y 78.7% cuando está madura, niveles bajos de grasa bruta, elevados niveles de fibra, y moderado nivel de proteína cruda, en promedio de la totora se compone de 2.1% de grasa bruta, 8.3% de proteína, 26.7% de fibra, 8.4% de ceniza, y 54.5% de extracto libre de nitrógeno (Collot, 1980), el estado de madurez tiene influencia sobre el contenido de proteína y fibra detergente ácido de la totora, sin afectar la fibra detergente neutro, puesto que la fibra detergente neutro incluye celulosa, hemicelulosa y lignina, y la fibra detergente ácido se ve conformada por celulosa y lignina, la totora madura tiene mayor contenido de ligno-celulosa y menor contenido de hemicelulosa que la totora tierna (Avalos, 2015).

Posee Hemicelulosa en 30 a 71%, x-celulosa de 66 a 79% y lignina un 27.8% (Hidalgo, 2007).

Su composición mineral según Collot (1980), quien a partir del análisis de materia seca, determinó la cantidad de sales minerales en *Schoenoplectus tatora*, así el contenido de potasio (5.85%), sodio (2,5%) están dados por niveles altos; en contraposición con el fósforo (0.20%), y los demás compuestos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición mineral de la totora.

Macrófita	K	Na	Ca	Mg	S ₂ O ₂	S	P	C	N	Fe	Cu	Mn	Zn	B
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
<i>Schoenoplectus</i>	5.85	2.50	0.90	0.19	1.07	0.77	0.20	29.7	1.88	950	5.5	97	14.5	160

Fuente: Collot (1980).

2.2.5. Marco Conceptual

Celulosa: Son moléculas de glucosa unidas entre sí a través de los enlaces β -1,4-glucosídico, para así formar cadenas de longitud enorme que dan lugar a las moléculas de celulosa (Gaitan & Lara, 2007).

Probiótico: Bacterias que tienen efectos benéficos para los seres humanos y los animales creando simbiosis con el huésped (García, 2010).

Prebiótico: Son un tipo de alimentos funcionales que funcionan como Ingredientes no digeribles que benefician al organismo, mediante el crecimiento y/o actividad de varias bacterias en el colon mejorando la salud del huésped (García, 2010).

Degradación: Disminución de la concentración de una sustancia que se encuentra en un ambiente o formando parte de una estructura (Gaitan & Lara, 2007).

Hidrólisis: Descomposición de sustancias orgánicas presentes en estructuras o libres por acción del agua u enzimas hidrolíticas (Lara & Acosta, 2013).

Azúcares reductores: Son el resultado de la degradación de carbohidratos en hidratos de carbono más simples como la glucosa, galactosa, sacarosa, etc. (Bello *et al.*, 2006).

Inmunología: Es la ciencia que estudia los mecanismos fisiológicos de respuesta del organismo frente a la presencia de microorganismos, toxinas o antígenos (Romeu, 2012)

Productividad: La productividad es una medida económica que calcula cuántos bienes y servicios se han producido por cada factor utilizado durante un periodo determinado (Urdaneta, 2009).

Colonización: Es el establecimiento de un conjunto de organismos en un ambiente óptimo con la intención de poblarlo y sobrevivir en dicho ambiente (World Gastroenterology Organisation, 2011).

Antibiótico: Sustancia química que destruye microorganismos, especialmente las bacterias (Romeu, 2012).

Suplemento: Los suplementos alimenticios o suplementos nutricionales son los que se ingieren para asegurar el consumo adecuado de nutrientes que requiere un organismo vivo (Soto, 2001).

Tolerancia: Es la capacidad que tiene un organismo para resistir y adaptarse al aporte de determinadas sustancias que se pueda encontrar (Lara & Acosta, 2013).

Digestibilidad: Es la facilidad que tiene un alimento para ser digerido por acción de enzimas u por otros medios como los probióticos (Sosa, *et al.*, 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ámbito de estudio

La presente investigación se realizó en dos locaciones:

Primero en la ciudad de Massiapo capital del distrito de Alto Inambari, provincia de Sandia de la Región Puno; ubicada en las coordenadas UTM -14.0905409, -69.24230840000001 (Figura 31), donde se recolectaron las termitas. Estas fueron colectadas junto con su termitero de un árbol infestado (Figura 6,a), con la ayuda de un machete se cortó la base del termitero que la unía al árbol para luego ser amoldada cortando los extremos del termitero a un tamaño de 37x21 cm para que este puede caber dentro de la caja de tecnopor previamente forrada interiormente con papel aluminio con el objetivo de mantener la temperatura ambiental y de que las termitas no puedan cavar túneles hacia el exterior (Figura 6,b), hasta que las muestras fueran procesadas en el Laboratorio.



Figura 6. a) Árbol infestado por termitas donde se aprecia el termitero de las mismas en la ciudad de Massiapo, Mayo 2017, b) Termitero amoldado al tamaño de la caja tecnopor forrada internamente con papel aluminio.

Usando una clave dicotómica de identificación de termitas descrita por (Syaukani & Thompson, 2011) y un microscopio digital modelo ND1506659, se identificó el género y especie de las termitas recolectadas como *Nasutitermes longinasus* (Figura 7).

Clave dicotómica de identificación descrita por Syaukani & Thompson (2011).

Key to the species of *Nasutitermes* based on the largest soldiers and largest workers

- 1 Soldier: antenna with 11 articles. [Worker: antenna with 12 articles.]..... *N. neoparvus*
- Soldier: antenna with 13 articles.....2
- 2(1) Soldier: dimorphic. [The largest and smallest individuals differ markedly in size.]..... *N. longinasus*
- Soldier: monomorphic.....3
- 3(2) Soldier: in dorsal view posterior margin of head capsule roundly convex in the middle, dorsal outline of head capsule (including rostrum) in profile nearly straight, maximum width of head capsule 1.23-1.32 mm. Worker: apical tooth of left mandible shorter than first marginal tooth..... *N. longinasoides*
- Soldier: in dorsal view posterior margin of head capsule nearly straight in the middle, dorsal outline (including rostrum) in profile nearly straight, downcurved apically, maximum width of head capsule 1.37-1.50 mm. Worker: apical tooth of left mandible longer than first marginal tooth.....*N. matangensis*



Figura 7. Especie de termita recolectada en Massiapo, identificada como *Nasutitermes longinasus* en el laboratorio de microbiología, Mayo 2017.

El segundo lugar donde se realizó la investigación fue en el distrito de Chucuito de la Provincia de Puno ubicada en las coordenadas UTM -16.6912081, -69.38310790000003 (Figura 32), en donde la ganadería es una práctica muy común y donde usan la totora como fuente de alimentación para el ganado, es por ello que en esta zona se recolecto la plata de totora (*Schoenoplectus tatora*), de la zona litoral al lago Titicaca.

3.2. Tipo de investigación

La investigación fue del tipo experimental analítico, ya que se aisló las bacterias de intestino de las termitas y se determinó su capacidad celulolítica, para luego someterlas a pruebas probióticas a las bacterias con mayor grado de hidrólisis de celulosa y finalmente realizar la prueba de degradación de la totora usando las bacterias en periodos de tiempo de 24, 48 y 72 horas.

3.3. Metodología

a. Aislamiento de bacterias celulolíticas del intestino de termitas e identificación de las que produzcan los mayores halos de hidrólisis de celulosa

Métodos usados: Punción por aguja fina (PAAF) para la extracción del intestino de las termitas, aislamiento primario en medio líquido para aislamiento primario de bacteria, sembrado en medio sólido para el aislamiento en colonias, ensayo de difusión en placa de agar con rojo Congo para la distinción de bacterias celulolíticas por la formación de los halos de hidrólisis y finalmente la identificación de las bacterias con el mayor halo.

Fundamentos de los métodos utilizados:

– Punción por aguja fina (PAAF)

La punción aspirativa con aguja fina es un método de diagnóstico rápido, eficaz, sencillo de ejecutar, de bajo costo y apenas causante de complicaciones leves, por lo que ha devenido el estudio fundamental, pues además de permitir iniciar la secuencia diagnóstica en el área clínica. En la actualidad, esta técnica es ampliamente utilizada y reconocida como proceder de carácter orientador y diagnóstico en diversos órganos y tejidos, pues permite diferenciar lesiones inflamatorias de las neoplásicas, estadificar tumores y detectar posibles recidivas, por citar algunas de sus ventajas (Escalona, 2012). En esta investigación se utilizó dicho proceso pero para la extracción de todo el intestino de la termita por ser esta tan diminuta.

– Aislamiento primario en medio líquido

Para realizar el estudio de las bacterias es necesario recuperarlas del hábitat natural donde se encuentran y hacer que proliferen en medios artificiales que les

proporcionen sus requerimientos nutricionales (Lagunas & Vega, 2013). Como su nombre lo indica, un medio de aislamiento primario se utiliza para aumentar el crecimiento de ciertas especies bacterianas. Se los suele utilizar en los laboratorios clínicos para la recuperación de especies de bacterias de muestras de heces. Los caldos de aislamiento primario son muy útiles para la recuperación de microorganismos de muestras de la microbiota normal de un ambiente determinado como el intestino humano o de animales ya que en el su ambiente se encuentra sustancias que mantienen un número indicado de especies por lo que su incremento de población en estos medios es muy importante para un posterior aislamiento (Koneman & Allen, 2008). En la presente investigación el medio de aislamiento primario fue el medio Luria Bertani marca LIOFILCHEM que es un medio general usado generalmente para pruebas moleculares o de capacidad bacteriana.

– **Aislamiento en medio sólido**

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el Medio de Cultivo y el crecimiento de los microorganismos es el Cultivo. Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial, éste debe reunir una serie de condiciones tales como: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad, un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante (Santambrosio *et al.*, 2009). El medio sólido para esta investigación fue el medio Luria Bertani marca LIOFILCHEM suplementada con 1% y 2% p/v de carboximetilcelulosa (CMC), ya que en la composición de este medio solo posee la Triptona 10g, el Extracto de levadura 5g y el cloruro de sodio 5g, no posee ningún hidrato de carbono fermentable, es por eso que al incorporar el CMC se convirtió en un medio ideal para el aislamiento de microorganismos celulolíticos al ser la celulosa presente el único hidrato de carbono fermentable.

– **Ensayo de difusión en placa de agar utilizando rojo Congo**

Teniendo como base la hidrólisis enzimática por parte de las bacterias se pueden usar varios métodos de identificación de la capacidad celulolíticas. La utilización de medios líquidos que contienen celulosa permiten estimar cualitativa y cuantitativamente los microorganismos degradadores de celulosa, pero los medios sólidos son generalmente más usados pero en estos las colonias de microorganismos que utilizan el sustrato son con frecuencia difíciles de diferencias de otros microorganismos que no lo hace, Theather & Wood, 1982, observaron que el rojo Congo podía ser usado en los ensayos para evidenciar la hidrólisis de polisacáridos debido a que el colorante forma complejos con las moléculas aún no hidrolizadas, facilitando así la diferenciación de las zonas de aclaramiento alrededor de las colonias (Gaitan & Lara, 2007). Es por ello que para esta investigación se usó el rojo Congo marca LOBACHEMIE como indicador de bacterias celulolíticas.

Procedimiento:

Para el aislamiento de bacterias celulolíticas del intestino de termitas, se aplicó la técnica de punción por aguja fina para la extracción del intestino donde se hallan dichas bacterias como parte de la microbiota de estos insectos descrita por Martínez *et al.* (2016) y Lara & Acosta (2013), para ello primero se extrajo a las termitas del termitero mediante la técnica de flotación en solución salina al 20% p/v, de ahí se separó a las termitas en 4 grupos cada uno de 25 individuos, luego fueron desinfectadas con detergente antibacterial y sacrificadas posteriormente, inmediatamente de ello se procedió a extraer el intestino de estas mediante la técnica de punción por aguja fina (PAAF) a través de la boca del insecto con la ayuda del microscopio digital modelo ND1506659, estas se adicionaron a 4 tubos de ensayo con 10ml de medio líquido Agua Peptonada marca MILLER por tubo y rotulados respectivamente (T1, T2, T3 y T4), en la cantidad de 25 intestinos por tubo, se agito fuertemente estos con el fin de que se liberaran la carga bacteriana al medio, luego pasaron a incubación a 37°C por un periodo de 24 horas en la incubadora marca MEMMER (Figura 8). Aparte de ello se escogió a 4 individuos al azar y se realizó la extracción de su intestino por el

mismo método para la observación al directo en microscopio compuesto marca NIKON con el fin de comprobar la existencia de microorganismos.

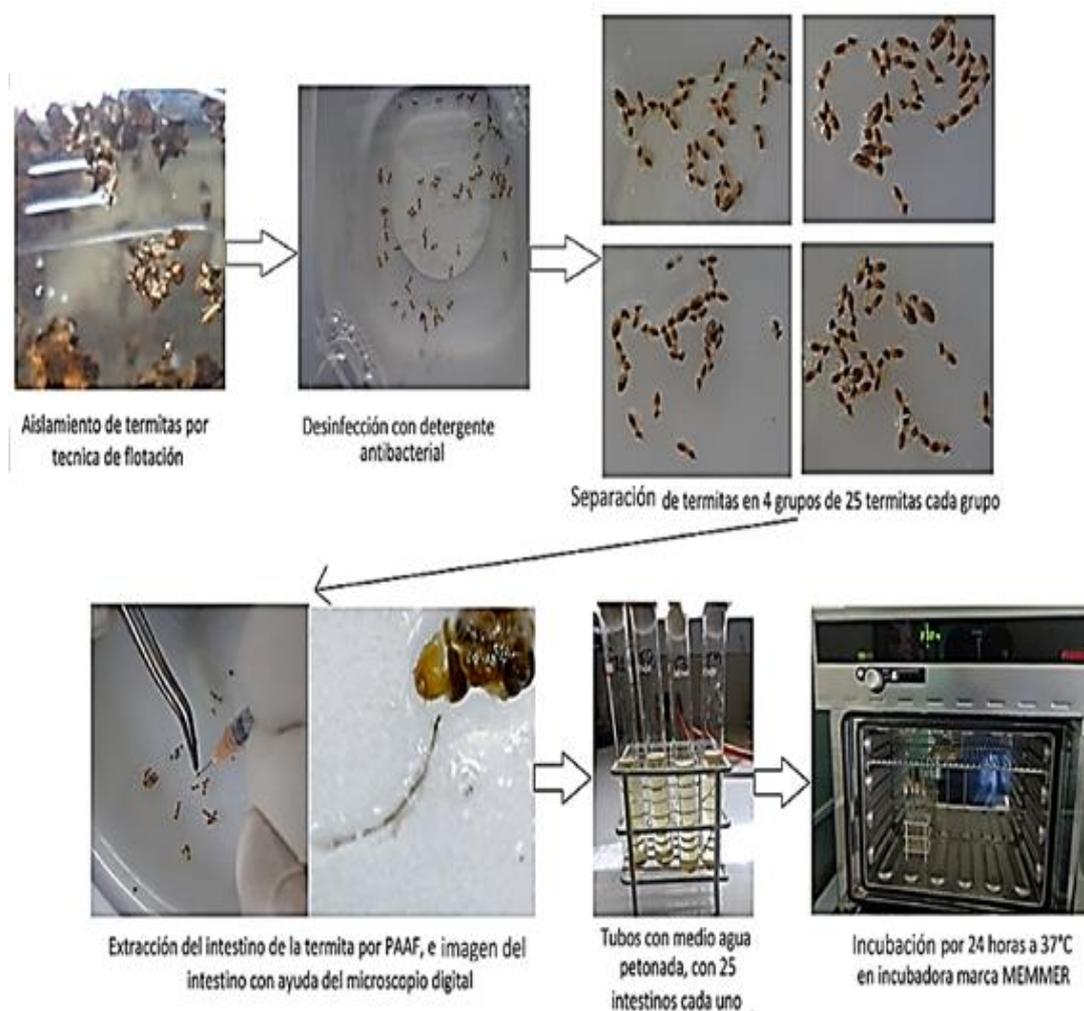


Figura 8. Proceso de aislamiento de bacterias celulolíticas del intestino de termitas en el laboratorio del CERITSS-Puno, Mayo 2017.

Pasando el tiempo de 24 horas se sacó de la incubadora los tubos y se observó la turbidez presente en ellos, indicador de presencia de bacterias, con lo cual se procedió a aislar dichas bacterias en el medio sólido Agar Luria Bertani suplementado con CMC al 1% p/v y un segundo aislamiento con 2% p/v, con la ayuda de una micropipeta calibrada a 200 μ L se tomó la muestra del macerado de cada tubo (T1, T2, T3 y T4) y se inóculo en el medio de cultivo, utilizando la metodología de sembrado por estría masiva en forma cruzada a la descarga se realizó el sembrado con el asa de Digrafsky; lo cual se realizó por triplicado, obteniendo así 12 placas de cultivo para el aislamiento de bacterias celulolíticas, las cuales entraron nuevamente en incubación por el periodo de 48 horas a 37°C, pasado este tiempo se observó el crecimiento de bacterias y se

procedió al ensayo de difusión con rojo Congo para observar, aislar e identificar a las bacterias con las mayores características celulolíticas que se determinó mediante la medición de los halos de hidrólisis que estas formaron (Figura 9).

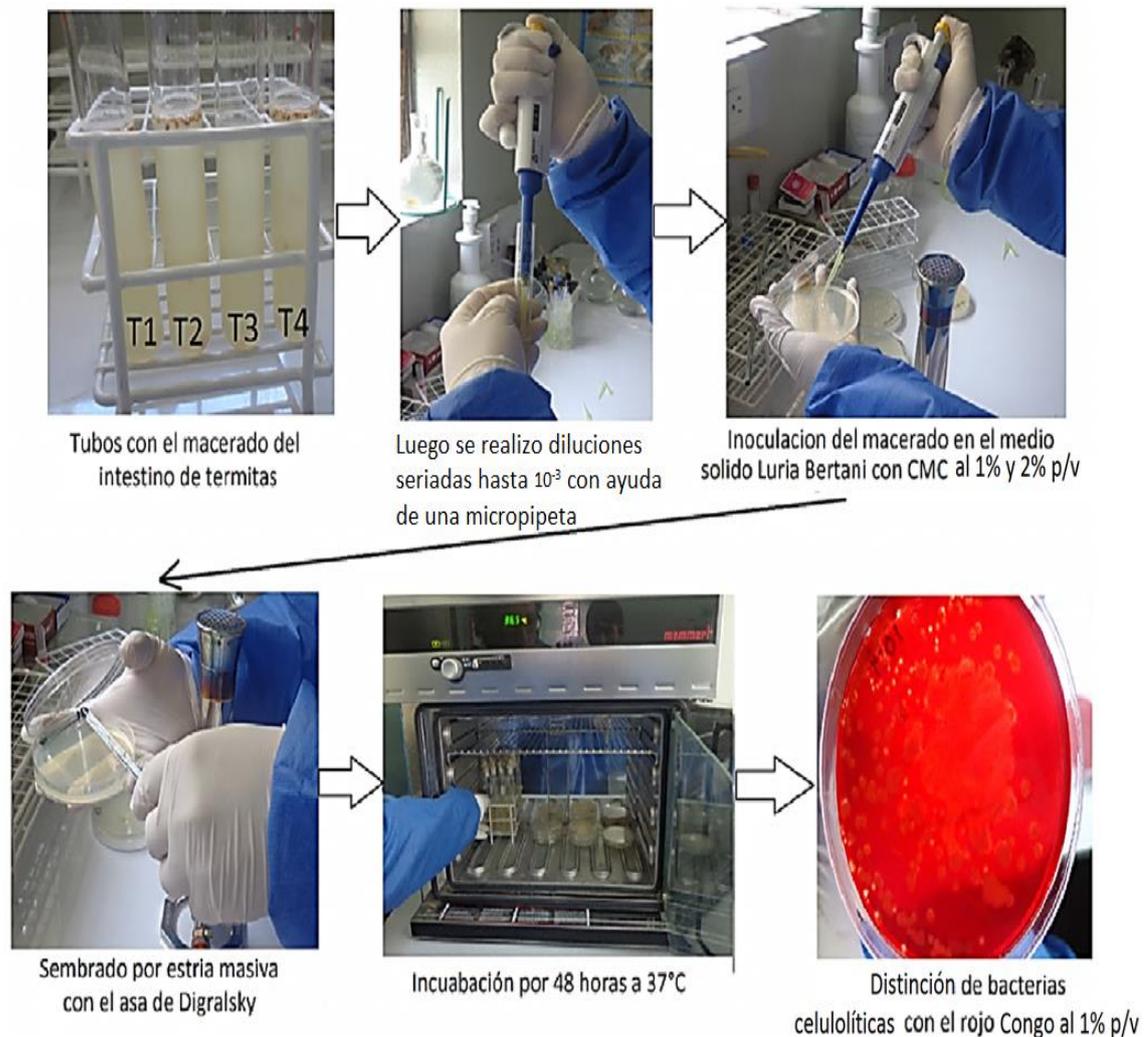


Figura 9. Proceso de aislamiento de bacterias celulolíticas en medio sólido realizado en el laboratorio del CERITSS-Puno, Mayo 2017.

Para la distinción de bacterias celulolíticas con el rojo Congo (Figura 9), se usó dicho colorante en concentración de 1% p/v, este se incorporó al medio de cultivo con las bacterias por un periodo de 10 minutos, pasado este tiempo se descartó el exceso de colorante y se lavó tres veces con solución salina (NaCl al 0.85%); seguidamente se seleccionaron y aislaron los microorganismos que presentaron halos claros de hidrólisis sobre el fondo rojo con un diámetro no menor a 5 mm y se purificaron con repiques sucesivos en medio de cultivo Tripticasa Soya Agar (TSA) marca MILLER.

Identificación de bacterias aisladas

Antes de realizar las pruebas probióticas a las bacterias que produjeron halos de hidrólisis más grandes, se identificó el género de cada una de estas usando la batería bioquímica de identificación de bioquímica, en la cual viene conformada por los medios sólidos Agar hierro tres azúcares (TSI), Lisina hierro agar (LIA), Citrato y el medio SIM (Hidrógeno sulfurado, Indol y movilidad).

– Prueba en Agar hierro tres azúcares (TSI)

Se usó para determinar si la bacteria fermenta alguno de los tres azúcares que están presentes en este medio (glucosa, sacarosa o glucosa) (Koneman & Allen, 2008).

Procedimiento.

Con una aguja bacteriológica se tomó la muestra de la colonia de bacteria a identificar y se sembró en el medio de cultivo inclinado, se realizó un piquete hasta el fondo el medio y luego estría en la superficie, luego se llevó a incubación por 24 horas a 37°C. Pasando este tiempo se observó si las reacciones bioquímicas por el viraje del color del medio de rojo a amarillo y la producción de ácido sulfúrico por un viraje a negro.

– Prueba de Agar lisina hierro agar (LIA)

Se usó para determinar si la bacteria descarboxila o desamina la lisina y forma ácido sulfúrico (H₂S) (Bailey & Scott, 2003).

Procedimiento.

Se tomó con la aguja bacteriológica la muestra de colonia a identificar y se sembró realizando 3 piquetes hasta el fondo inclinado del agar y luego estría simple en la superficie, luego se llevó a incubación por 24 horas a 37°C, pasando este tiempo se observó las reacciones bioquímicas en el medio por el viraje de color del medio de violeta a amarillo o lila intenso.

– **Prueba del Citrato**

Este medio permite observar si la bacteria es capaz de utilizar el citrato como única fuente de energía y carbono (Koneman & Allen, 2008).

Procedimiento.

Se tomó nuevamente con la aguja bacteriológica la muestra de colonia y se sembró sobre la superficie del medio inclinado por método de estría simple, luego se llevó a incubación por 24 horas a 37°C, pasado este tiempo se observó la reacción bioquímica en caso de ser positiva el medio se torna azul y negativa mantiene su color verde original.

– **Prueba del SIM (Hidrógeno sulfurado, Indol, Movilidad)**

Este medio se usa más que todo para observar si las bacterias producen el indol mediante la degradación del tryptofano, ver la movilidad y en ocasiones la producción de hidrógeno sulfurado (Bailey & Scott, 2003).

Procedimiento.

Se tomó la muestra de bacteria con la aguja bacteriológica y se sembró en el medio realizando una punzada hasta la $\frac{3}{4}$ partes del medio y se llevó a incubación por 24 horas a 37°C, pasado este tiempo se le incorporo el reactivo de Kovac para observar la presencia del indol en cuyo caso si se forma un anillo rosado es indol positivo, también se observó la movilidad y la presencia de hidrógeno sulfurado si este se tornara negro.

Todos estos resultados se compraran en la Tabla 4 para la identificación bioquímica de las bacterias.

Tabla 4. Clave de identificación de enterobacterias.

Grupo I Hidrógeno Sulfurado (H ₂ S) Positivo								
Anaerogenicos (Gas negativo)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CITRATO	UREA	MOV	ENTEROBACTERIA
K/A	-	+ ó -	K/K	-	-	-	-	<i>Salmonella typhi</i>
Aerogenicos (Gas positivo)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CITRATO	UREA	MOV	ENTEROBACTERIA
K/A	2+	4+	K/K	-	+	-	-	<i>Salmonella</i>
K/A ó A/A	2+	4+	K/K	-	+	-	+	<i>Arizona</i>
K/A ó A/A	2+	4+	K/A	-	+	-	+	<i>Citrobacter</i>
K/A ó A/A	2+	4+	R/K	+ ó -	D	+	+	<i>Proteus</i>
K/A	2+	4+	K/K	+	-	-	+	<i>Ewardsiella</i>
Grupo II Hidrógeno Sulfurado (H ₂ S) Negativos								
Anaerogenicos (Gas negativo)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CITRATO	UREA	MOV	ENTEROBACTERIA
K/A	-	-	K/A	+ ó -	-	-	-	<i>Shigella</i>
A/A ó K/A	-	-	K/K ó K/N	+	-	-	V	<i>Escherichia</i>
A/A ó K/A	-	-	K/A	+ ó -	+	D	+ ó V	<i>Enterobacter</i>
A/A	-	-	K/K	-	+	-	+ ó V	<i>Serratia</i>
K/A	-	-	R/A	+	D	+	+	<i>Proteus</i>
K/A	-	-	R/A	+	+	-	+ ó -	<i>Providencia</i>
A/A	-	-	A/A ó K/A	+ ó -	-	V	V	<i>Yersinia</i>
Aerogenicos (Gas positivo)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CITRATO	UREA	MOV	ENTEROBACTERIA
A/A ó K/A	2+	-	K/K ó K/A	+	-	-	V	<i>Escherichia</i>
A/A	4+	-	K/K	+ ó -	+	+	-	<i>Klebsiella</i>
A/A ó K/A	3+	-	K/K ó K/A	-	+	D	+ ó V	<i>Enterobacter</i>
K/A ó A/A	2+	-	K/K	-	+	-	+ ó V	<i>Serratia</i>
K/A	+	-	K/A ó R/A	+	D	+	+	<i>Proteus</i>
K/A	+	-	K/A ó A/A	-	+	-	V	<i>Paratyphi A</i>

K= alcalino; A= ácido; R= Rojo; N= neutro; V= variable

Fuente: Terragno *et al.* (2007).

– **Tinción Gram**

Este método permitió observar la morfología de las bacterias y a que grupo de bacterias pertenecen, Gram positivas o Gram negativas. Para esto se utilizó el: Cristal violeta, lugol, alcohol acetona y safranina (López *et al.*, 2014).

Procedimiento.

Se escogió la bacteria para realizar la tinción con ayuda del asa bacteriológica y se la extendió en un portaobjeto con una gota de agua destilada, se pasó por la flama del mechero para fijarla, posteriormente se le incorporo el cristal violeta por el periodo de 1 minuto, a continuación se lavó con abundante agua para eliminar el exceso de colorante, seguido de ello se incorporó el lugol por 1 minuto, igualmente pasado este tiempo se lavó con abundante agua, pasado ello se pasó a decolorar con el alcohol acetona por 30 segundos y con mucha rapidez se lavó el exceso de decolorante para evitar problemas, finalmente se usó la safranina como colorante de distinción por 1 minuto, pasado ello se lavó con agua y se dejó secar las láminas a temperatura ambiente, finalmente se observó al microscopio compuesto marca NIKON con el objetivo de 100X con ayuda del aceite de inmersión.

– **Prueba de la catalasa**

La catalasa es una enzima que tiene la mayoría de las bacterias, cuya función es catalizar la ruptura del agua oxigenada, liberando oxígeno al ambiente (Llanos, 2017).

Procedimiento.

Se tomó con el asa bacteriológica una colonia de la bacteria a identificar y se le incorporo agua oxigenada (H_2O_2), se observó si la reacción era positiva en la cual se genera producción de oxígeno con burbujeo constante o negativa donde no hay reacción.

b. Evaluación de las características probióticas *in vitro* de las bacterias celulolíticas

Para estas pruebas se seleccionaron las bacterias que presentaron mayor grado de hidrólisis de celulosa, a las cuales se les sometió a 5 pruebas probióticas para comprobar si estas presentan características de ser probióticas (todos ellos asemejándose lo más posible al rumen de los animales rumiantes).

Para todas estas pruebas se realizó la preparación del inóculo inicial que constaba de un número establecido de individuo de 1.5×10^8 UFC/ml, para lo cual se usó la escala de McFarlam standard N° 0.5.

Fundamento de la escala de McFarlam: Los patrones de McFarlam se utiliza como patrones de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos. El patrón 0.5 de McFarlam tiene una aplicación especial en la preparación de inóculos bacterianos para la realización de pruebas (Bacton Dickinson and Company, 2005).

Procedimiento.

La preparación del inóculo para todas las pruebas probióticas se realizó mediante el enriquecimiento de la bacteria previamente aislada en cepa pura en caldo Luria Bertani marca LIOFILCHEM, en un matraz Erlenmeyer en relación 1/5, dejando este en incubación por 12 horas a 37°C y a 150 rpm, pasado este tiempo se verifico la pureza mediante una tinción Gram (Ortiz & Reuto, 2007).

Luego de comprobar la pureza del inóculo se tomó con una pipeta una muestra del inóculo y se incorporó a un tubo de ensayo que contenía 5 ml de caldo Luria Bertani estéril, esto se realizó hasta obtener un grado de turbidez semejante a la escala de McFarlam 0.5, para así obtener el inóculo de 1.5×10^8 UFC/ml con lo cual se realizaron las pruebas probióticas (Figura 10).



Figura 10. Preparación del inóculo final con la escala de McFarlam 0.5 en el laboratorio del CERITSS-Puno, Junio 2017.

La confirmación de la supervivencia de las bacterias viables se dio mediante la técnica de conteo en placa y la fórmula descrita por (Cueto *et al.*, 2010) (Figura 11).

$$\% \text{ de supervivencia} = \frac{\log \text{UFC} N_1}{\log \text{UFC} N_0} \times 100$$

Figura 11. Fórmula de porcentaje de supervivencia a sales biliares. Fuente: (Cueto *et al.*, 2010).

Dónde:

N_1 = Total de células viables después de los tratamientos y

N_0 = Número inicial de células inoculadas.

1) Prueba de tolerancia a distintos niveles de temperatura

En esta prueba probiótica se utilizaron tubos de ensayo de 15 ml de capacidad, con 9 ml de caldo Luria Bertani a pH 6,5 a los cuales se les añadió 1 ml del inóculo inicial (1.5×10^8 UFC/ml) de las bacterias seleccionadas los cuales luego fueron incubados a distintas temperaturas de 20°C (temperatura comercial), a 37°C (temperatura del animal antes de llegar al rumen) y 45°C (temperatura ruminal) por 24 horas, pasado este tiempo se determinó el crecimiento mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 540 nm (método de turbimetría) según lo descrito por (Avila *et al.*, 2010).

Definición del método de turbimetría: La turbidimetría mide la reducción de la transmisión de luz debido a partículas de una suspensión y cuantifica la luz residual transmitida. Las suspensiones bacterianas dispersan la luz, al igual que cualquier partícula pequeña suspendida en agua (efecto Tyndall). La dispersión de la luz es, dentro de ciertos límites, proporcional a la masa del cultivo. Estudios teóricos y experimentales han mostrado que soluciones diluidas de diferentes tipos de bacterias, independientemente del tamaño celular, tienen casi la misma absorbancia por unidad de concentración de peso seco. Esto quiere decir que, en soluciones diluidas, la absorbancia es directamente proporcional al

peso seco, independientemente del tamaño celular del microorganismo. Sin embargo, se encuentran absorbancias muy diferentes por partícula o por UFC cuando los tamaños de las células bacterianas son diferentes. Por esta razón, para estimar el número de microorganismos totales o el número de microorganismos viables de una suspensión bacteriana debe realizarse una "curva de calibración" con cada tipo de microorganismo, sólo de esta forma es posible relacionar Absorbancia (Densidad Óptica) con el número de microorganismos totales o con UFC (Vásquez, 2011). Para lo cual se preparó la escala de McFarlam (Anexo B) para obtener así la curva de calibración y la fórmula ($y=0.0534x+0.32$ Donde x es igual a UFC/ml; $r= 0.9354$).

2) Prueba de tolerancia a sales biliares

Para esta prueba se preparó en 3 fiolas caldo Luria Bertani suplementado con sales biliares en concentración de 0.0% (que sirvió como control), 0.3% y 0.6%, con un pH del medio de 7 (neutro). Luego de ello se incorporó 9 ml de caldo preparado de cada fiola en tubos de ensayo de 15 ml de capacidad rotulados debidamente; seguido de ello se incorporó a cada tubo 1 ml del inóculo preparado (1.5×10^8 UFC/ml) de cada bacteria seleccionada, finalmente se llevó a incubación a 37°C por 24 horas. La confirmación de la supervivencia de las bacterias viables se dio mediante la técnica de conteo en placa y la fórmula descrita por (Cueto *et al.*, 2010) (Figura 11).

Definición de conteo en placa: La técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un g o ml de muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una UFC. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo (Llanos, 2017). Para lo cual, luego del periodo de incubación se realizó diluciones seriadas hasta 10^{-8} y fueron sembradas en placas con medio Muller Hinton marca MILLER sólo las 3 últimas diluciones (10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}) en

una cantidad de 20 µl por cada dilución. Luego se llevaron a incubación por 24 horas, pasado este tiempo se contabilizó las bacterias que crecieron en las placas y se llevó este resultado a la fórmula (Figura 12) para obtener el resultado final del conteo en placa.

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias contadas luego de 24 horas}}{\text{Cantidad de muestra sembrada}}$$

Figura 12. Fórmula para conteo en placa de bacterias. Fuente: (Izurietta, 2011)

3) Prueba de tolerancia al cloruro de sodio (NaCl)

Igual que en la prueba de tolerancia a sales biliares se preparó primero el caldo Luria Bertani suplementado esta vez con diferentes concentraciones de NaCl, al 0% (control), al 4% y al 8%, luego se pasó 9 ml de cada fiola a tubos de ensayo con capacidad de 15 ml, para luego colocar 1 ml del inóculo (1.5×10^8 UFC/ml) de cada bacteria seleccionada a sus tubos previamente rotulados, finalmente estos pasaron a incubación por 24 horas a 37°C. La determinación del crecimiento se realizó mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 540 nm todo ello según lo descrito por (Rondón *et al.*, 2009).

4) Prueba de tolerancia a distintos valores de pH

Para esta prueba de resistencia a pH se realizó virando hacia la acidez el caldo Luria Bertani mediante el uso del ácido clorhídrico (HCl) para obtener valores de pH de 5, 6 y 7 (control) que se prepararon igualmente en fiolas, luego de ello se incorporó 9 ml de cada preparado a los tubos de ensayo de 15 ml de capacidad, luego se incorporó el inóculo (1.5×10^8 UFC/ml) de bacterias celulolíticas previamente seleccionadas, estas se llevaron a incubación por 24 horas a 37°C. Pasado este tiempo se evaluó la viabilidad del microorganismo mediante el conteo en placa, descrito por (Ortiz & Reuto, 2007).

5) Prueba de antagonismo

Para realizar esta prueba de antagonismo se siguió el método de Gauza, para lo cual se preparó una suspensión en solución salina al 0.85% (p/v) de 10 ml de cada uno de los microorganismos seleccionados por presentar mayor hidrólisis de la celulosa, llevando a incubación a 100 rpm a 35°C durante 14 horas. Luego de todo ello se preparó el agar TSA en placas Petri en la cual se excavo posos de 1cm de diámetro sin tocar el fondo de la placa, teniendo ello listo se sembró a la bacteria *Escherichia coli* en concentración de 1.5×10^8 UFC/ml por el método de siembra masiva en toda la superficie de la placa sin tocar el interior de los pozos, se colocó 50 µl del microorganismo celulolítico que actuó como el antagonista, usando como control negativo agua destilada y control positivo el antibiótico ciprofloxacino; se tuvo como criterio de selección halos de inhibición mayores a 5 mm como lo menciona (Gaitan & Lara, 2007).

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorio, los tratamientos correspondieron a las pruebas probióticas realizadas (tolerancia a distintos niveles de temperatura, sales biliares, cloruro de sodio, pH y pruebas de antagonismo) que formaron un total de 36 unidades experimentales cada uno (180 unidades experimentales en total). Los resultados de cada prueba, fueron sujetos a pruebas descriptivas (media) y de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación), posteriormente se realizó los análisis de varianza (ANAVA) y prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) para la comparación entre los tratamientos de cada variable, todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de confianza de 95%. Los datos se procesaron con el software estadístico INFOSTAT versión estudiantil 2017 para Windows.

Fórmula de la media: Esta fórmula se obtiene sumando todos los valores en una población y dividiendo el total entre el número de valores que se sumaron.

$$Media = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

Donde $\sum_{i=1}^N xi$ indica que se deben sumar todas las (x) disponibles desde xi hasta xN . La secuencia de valores que debe sumarse se especifica mediante los símbolos N e $i = 1$ que aparecen arriba y debajo de la letra griega Σ (sigma). El resultado tiene la misma unidad de medida que las lecturas individuales. La media se representa simbólicamente por la letra griega μ (mu) cuando se obtiene de datos poblacionales, y mediante \bar{X} cuando se estima a partir de una muestra aleatoria simple (Llanos, 2017).

Fórmula de desviación estándar: Es la raíz cuadrada de la varianza (Llanos, 2017).

$$S = \sqrt{S^2}$$

Dónde: S indica desviación estándar y S^2 varianza

Fórmula de coeficiente de variación: Es el cociente entre la desviación estándar y la media muestral, expresado en porcentaje (Llanos, 2017).

$$cv = \frac{s}{\bar{X}} 100\%$$

Dónde:

CV= coeficiente de variación

s= desviación estándar de la muestra

\bar{X} = media aritmética de la muestra

Modelo matemático de análisis de varianza: Es un procedimiento que descompone la variabilidad total en la muestra (suma de cuadrados total de las observaciones) en componentes (suma de cuadrados) asociados cada uno a una fuente de variación reconocida (Llanos, 2017).

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Observación del tratamiento

μ = Promedio general

t_i = efecto del tratamiento i

ϵ_{ij} = término de error aleatorio asociado a la observación Y_{ij}

Las pruebas estadísticas se evaluaron:

- Si el resultado es $p < 0,05$ las pruebas son significativas.
- Si el resultado es $p > 0,05$ las pruebas no son significativas.

Fuente: (Ibañez, 2009).

Fórmula para prueba de Tukey: Calculó como valor crítico para la identificación de diferencias significativas, una cantidad (DMS) basada en el cuartil correspondiente de la distribución de rangos estudentizados (Llanos, 2017).

$$W_{ij} = q \times \frac{CME}{r}$$

Dónde:

W_{ij} = comparador para el par de tratamientos ij

q = valor de la tabla de tukey, con grados de libertad de tratamientos y grados de libertad del error

CME = cuadrado medio del error

r = son las repeticiones de los tratamientos.

c. **Determinación del potencial de las bacterias celulolíticas en la degradación de la totora (*Schoenoplectus tatora*) en condiciones controladas**

El experimento se realizó *in vitro* utilizando plantas de totora, las cuales fueron seleccionadas con cuidado, procurando que estén sanas y maduras, tal y cual son

usadas como forraje en la alimentación del ganado en las zonas circulares al lago Titicaca.

Procedimiento.

Las plantas de totora recolectadas primeramente fueron lavadas con agua destilada a pH neutro de 7, luego fueron secadas en un horno marca IMACO a 100°C por 40 minutos, pasado este tiempo se las molió hasta conseguir trozos de 1 a 2 mm de longitud. El molido se colocó en tubos de ensayo de 15ml de capacidad en cantidad de 1 g por tubo, estas fueron esterilizadas a 121°C por 30 minutos en autoclave marca MEMERK, pasado ello se les incorporo 9 ml de caldo Luria Bertani estéril a cada tubo con la totora molida, para finalmente incorporar 1ml del inóculo (1.5×10^8 UFC/ml) de bacterias seleccionadas anteriormente, estas fueron incubadas en tres tiempos diferentes de 24, 28 y 72 horas; pasado estos tiempos se extrajo el sobrenadante y se determinó la concentración de azúcares reductores mediante la técnica de la prueba del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) utilizando un espectrofotómetro y una longitud de onda de 540 nm; para lo cual también se preparó la curva de calibración de la glucosa para la determinación cuantitativa de los azúcares reductores, todo ello descrito por (Lara & Acosta, 2013).

Preparación de la curva de calibración de la glucosa: Para realizar esta curva se preparó una solución patrón de glucosa en concentraciones de 0.2, 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.7 y 2.0 gramos de glucosa en 1L de agua cada una, y utilizando el método DNS (Figura 13) se desarrolló la curva de calibración (Bello *et al.*, 2006), más la ayuda del espectrofotómetro marca SPECTONIC 20D con lo cual se midió la absorbancia de cada preparado (ANEXO B). Los resultados se llevaron al software INFOSTAT para hallar la fórmula de la curva:

$$Y = 0.9318X + 0.3273$$

Dónde: X es igual a la cantidad de glucosa en la muestra.

Y también determinar el coeficiente de correlación ($r = 0.8748$) para comprobar así si nuestros resultado de la curva de calibración eran: coeficiente de correlación muy

alto ($r= 0.8$ a $r= 1.0$); alto ($r= 0.6$ a $r= 0.7$); bajo ($r= 0.4$ a $r= 0.5$) y muy bajo ($r= 0.2$ a $r= 0.3$) según lo descrito por (Ibañez, 2009).



Figura 13. Desarrollo de la curva de calibración de la glucosa en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA-Puno, Junio 2017.

Para establecer la digestibilidad de la totora por parte de las bacterias celulolíticas seleccionadas se extrajo el medio líquido sobrante de cada tubo de ensayo con una pipeta, con el fin de sólo quedarnos con la materia sólida sobrante la cual fue llevada a secado en el horno a 60°C por 1 hora. Pasado este tiempo se pesó la materia vegetal residual la cual se restó a la cantidad inicial de materia vegetal en cada tubo que fue de 1g para así calcular el porcentaje de digestibilidad de acuerdo a la siguiente ecuación descrita por Sosa *et al.* (2006).

$$\% \text{ de digestibilidad} = \frac{\text{PMS} - \text{R}}{\text{PMS}} \times 100$$

Figura 14. Fórmula para determinar el porcentaje de digestibilidad. Fuente: (Sosa *et al.*, 2006).

Dónde:

PMS= Peso inicial de la materia seca.

R= Residuo o peso final de la materia seca.

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Análisis estadístico

Los tratamientos correspondieron a los tiempos de degradación de la totora (24, 48 y 72 horas). La unidad experimental fue constituida por 36 unidades experimentales. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante pruebas estadísticas descriptivas (media) y dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación) y prueba de normalidad (Shapiro-Wilks modificado). Luego de ello para determinar si existieron o no diferencia estadística significativa entre los tratamientos, se aplicó la prueba de análisis de varianza, seguido de ello se realizaron la prueba de contraste de Tukey ($P \leq 0,05$), todo ello a un nivel de confianza del 95%.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento de bacterias del intestino de termitas con capacidad celulolítica e identificación de los que produzcan mayor halo de hidrólisis de celulosa.

Se aisló 13 bacterias con actividad celulolítica de un total de 46 bacterias aisladas en la primera prueba con CMC al 2% p/v y 11 bacterias celulolíticas en la segunda fase con CMC al 1% p/v de un total de 52 bacterias aisladas, todas con características culturales propias; y todas Gram negativas, variando en la morfología entre micrococcos y bacilos.

De las bacterias celulolíticas aisladas en la primera prueba (CMC al 2% p/v), la mayoría resultaron bacilos Gram negativos (11 de 13 bacterias), mientras que los 2 restantes fueron micrococcos Gram negativos. A todas estas bacterias aisladas se les asignó un rótulo (BCn; dónde n fue el número asignado para cada bacteria) de las cuales las bacteria BC3 y BC9 presentaron el mayor grado de hidrólisis del CMC con diámetros de halos de 10.5 y 9.3 mm respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5. Caracterización de las bacterias aisladas con CMC al 2% p/v en el laboratorio del CERITSS-Puno, Junio 2017.

Rotulo de la bacteria	Morfología	Tinción Gram	Diámetro de halo de hidrólisis (mm)	Características culturales
BC1	Bacilos cortos	Negativos	6.0	Mucoide, bordes irregulares, aplanado, color café.
BC2	Bacilos cortos	Negativos	5.1	Mucoide, bordes irregulares, plano, color café claro.
BC3	Bacilos largos	Negativos	10.5	Mucoide, verdes regulares, plano, color blanco.
BC4	Bacilos largos	Negativos	5.2	Mucoide, borde irregular, aplanado, color café.
BC5	Bacilos cortos	Negativos	7.4	Seco, borde regular, cóncavo, color blanco
BC6	Bacilos largos	Negativos	5.0	Seco, borde regular, cóncavo, color blanco.
BC7	Bacilos cortos	Negativos	5.3	Seco, borde regular, cóncavo, color blanco
BC8	Bacilos cortos	Negativos	7.1	Mucoide, borde regular, cóncavo color café.
BC9	Micrococcos	Negativos	9.3	Mucoide, borde regular, plano, traslucido.
BC10	Micrococo	Negativos	3.0	Mucoide, borde irregular, aplanado, color café.
BC11	Bacilos largos	Negativos	8.7	Seco, borde regular, cóncavo, color blanco
BC12	Bacilos cortos	Negativos	5.8	Mucoide, borde regular, puntiforme, color blanco
BC13	Bacilos largos	Negativos	6.3	Mucoide, bode irregular, aplanado.

Los resultados obtenidos en esta primera prueba son similares a los obtenidos por Lara & Acosta (2013), quienes obtuvieron un aislamiento de bacterias celulolíticas del intestino de termitas *Nasutitermes nigriceps* con halos de hidrólisis de 7, 10, 14 y 12 mm, por otro lado Ortíz *et al.* (2010), obtuvieron halos de hidrólisis de 3 a 15 mm de diámetro con cepas de bacterias aisladas del agua de remojo residual del maíz.

En la segunda prueba con CMC al 1% p/v se pudo apreciar una diferencia en el aislamiento de bacterias degradadoras de celulosa (BDCn, donde n fue el número asignado para cada bacteria), donde de las 11 bacterias aisladas, 9 fueron micrococos revelados mediante tinción Gram y únicamente 2 bacilos (BDC9 y BDC10) con características culturales propias, de las cuales se pudo apreciar que el mayor grado de hidrólisis de CMC la presentaron las bacterias BDC4, BDC10 y BDC11 con 10.7, 12.3 y 11.7mm de diámetro de hidrólisis respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Caracterización de las bacterias aisladas con CMC al 1% p/v en el laboratorio del CERITSS-Puno, Junio 2017.

Rotulo de la bacteria	Morfología	Tinción Gram	Diámetro de halo de hidrólisis (mm)	Características culturales
BDC1	Micrococos	Negativos	6.1	Mucoide, borde regular, cóncavo, color dorado.
BDC2	Micrococos	Negativos	8.0	Mucoide, borde regular, cóncavo, color blanco.
BDC3	Micrococos	Negativos	8.3	Mucoide, borde regular, cóncavo, centro negro y bordes traslucidos
BDC4	Micrococos	Negativos	10.7	Mucoide, borde regular, aplanado, color blanco.
BDC5	Micrococos	Negativos	9.0	Mucoide, borde irregular parecido a una estrella, aplanado, color amarillo
BDC6	Micrococos	Negativos	8.5	Mucoide, borde regular, cóncavo, color blanco
BDC7	Micrococos	Negativos	9.2	Mucoide, borde regular, cóncavo, color amarillo.
BDC8	Micrococos	Negativos	10.4	Mucoide, borde regular, cóncavo, color blanco
BDC9	Bacilos cortos	Negativos	8.8	Mucoide, borde irregular, cóncavo, brillante color amarillo.
BDC10	Bacilos cortos	Negativos	12.3	Mucoide, bordes irregulares, cóncavo, color amarillo con bordes traslucidos.
BDC11	Micrococos	Negativos	11.7	Mucoide, borde irregular, aplanado.

Los resultados obtenidos en esta segunda fase son similares a los obtenidos por Sakar *et al.* (1988), que encontró a *Micrococcus luteus* y *Micrococcus roseus* como bacterias degradadoras de varios tipos de celulosa mediante producción de celulasas endógenas y exógenas *in vitro*, aisladas de la microbiota de la termita *Odontotermes obesus*.

El crecimiento en las placas (Figura 15.a.) de las colonias de bacterias celulolíticas (Figura 15.b.) se caracterizaron por presentar halos claros de hidrólisis (Figura 15.d.) cuando estas fueron incorporadas con el rojo Congo al 1% p/v (Figura 15.c.), lo cual demuestra que estas bacterias tienen el potencial de degradar la celulosa. Aquellas bacterias que presentaron halos de hidrólisis más altos fueron aisladas en cepa pura en el medio TSA, para elegir así a las cepas más eficientes para llevarlas a las pruebas probióticas.

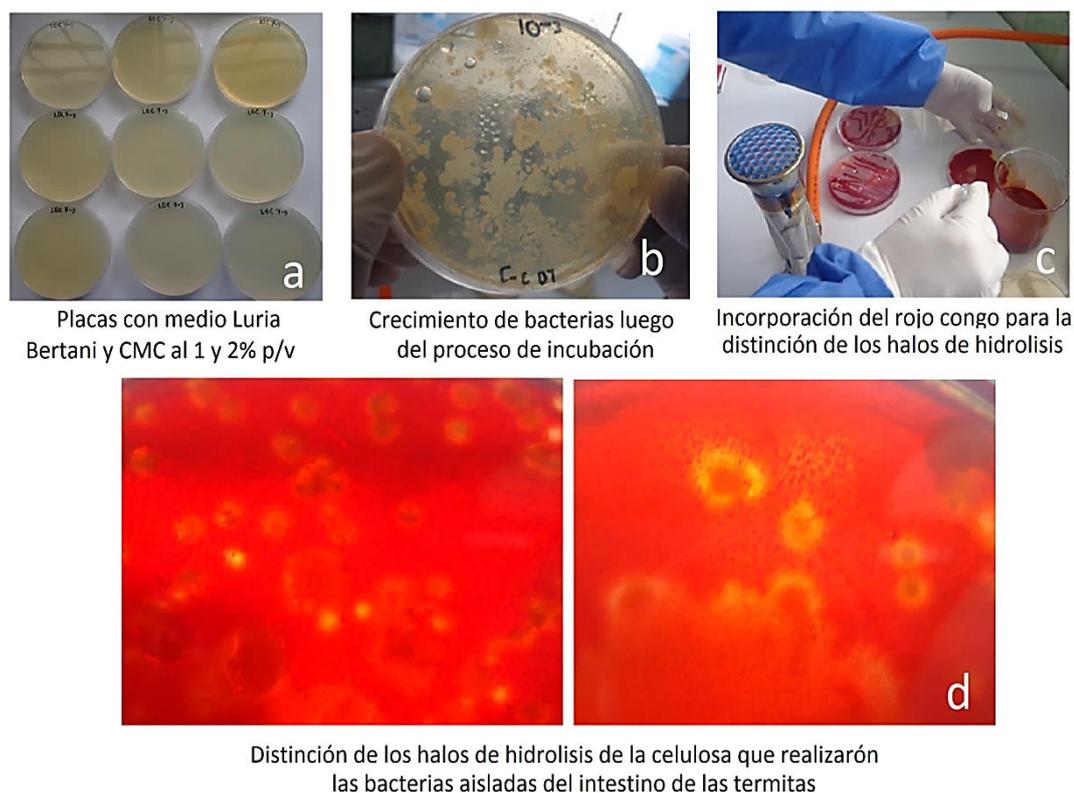


Figura 15. Resultados del aislamiento de bacterias celulolíticas obtenidas en el laboratorio del CERITSS-Puno, Junio 2017.

La distinción de los halos de hidrólisis se logró debido a que el colorante formó complejos con las moléculas de celulosa aún no hidrolizadas en el medio de cultivo, facilitando así la diferenciación de las zonas de aclaramiento alrededor de las colonias (Gaitan & Lara, 2007).

Se seleccionó a las bacterias con el mayor grado de hidrólisis de celulosa para pasar a las pruebas probióticas las cuales fueron las bacterias BC3 (Bacilo), BDC4 (Micrococo), BDC10 (Bacilo) y BDC11 (Micrococo), que presentaron halos de hidrólisis de diámetros de 10.5, 10.7, 12.3 y 11.7 mm respectivamente, las cuales fueron identificadas por pruebas bioquímicas y de la catalasa (Tabla 7) como *Escherichia spp.* (BC3), *Enterobacter spp.* (BDC10), y como *Micrococcus spp.* (BDC4 y BDC11); lo cual es parecido a los descubrimientos reportados por Lara & Acosta (2013), que aislaron a *Enterobacter aerogenes* como la bacteria que mejor resistió a las pruebas probióticas y que presentó el mayor halo de hidrólisis de la celulosa (14 mm de diámetro). Este tipo de bacteria igualmente ya había sido reportada por Ramin *et al.* (2008), como habitante del intestino de termitas *Coptotermes curgathus*, mientras que Sakar *et al.* (1988), describe a *Micrococcus luteus* y *Micrococcus roseus* como bacterias degradadoras de celulosa aisladas de la microbiota de la termita *Odontotermes obesus*, como también Grassé (1982) identificó en *Coptotermes lacteus* las bacterias que pertenecen a los géneros *Enterobacter* y *Streptococcus*, y en *Nasutitermes exitiosus*, identificó a los *Streptococcus* como los más abundantes sobre todas las demás bacterias.

Estas bacterias tienen la capacidad para degradar la celulosa gracias a las enzimas que poseen que son producto de la adaptación genética de las bacterias, poseendo genes para sintetizarlas como los genes Cel7A/CBHI, XYN1, CBHII, XYN2 y Bg11, y otros como GAL4 que, presumiblemente, no sólo es el regulador de la expresión de más de 10 genes involucrados en la degradación de xilano, sino también de la expresión de genes de la degradación de la celulosa (Martínez *et al.*, 2008).

Tabla 7. Identificación del género de las bacterias seleccionadas para las pruebas probióticas en el laboratorio del CERITSS-Puno, Junio 2017.

Rótulo de la bacteria	TSI	LIA	Citrato	SIM	Catalasa	Bacteria identificada
BDC10	K/A ⁺⁺⁺	K/k	Positivo	Neg,Neg, Post	Positivo	<i>Enterobacter spp.</i>
BC3	A/A ⁺⁺	K/A	Negativo	Neg,Post, Neg	Positivo	<i>Escherichia spp.</i>
BDC11	Por su forma se determinó que es una especie de <i>Micrococcus spp.</i>					
BDC4	Por su forma se determinó que es una especie de <i>Micrococcus spp.</i>					

Donde: +,-=cantidad de gas producido, SIM= Hidrógeno sulfurado, Indol y Movilidad.

4.2. Evaluación de las características probióticas *in vitro* de las bacterias celulolíticas, mediante tolerancia a temperatura, sales biliares, cloruro de sodio, pH y pruebas de antagonismo.

4.2.1. Prueba de tolerancia a distintos niveles de temperatura

Las bacterias BC3, BDC4, BDC10 y BDC11 tuvieron mejor resistencia a las temperaturas de 37 y 20°C; mientras que a la temperatura de 45°C se observó una disminución en la densidad poblacional (Figura 16), pero está se mantuvo en un promedio de 1.59×10^8 UFC/ml lo cual es muy importante ya que las bacterias probióticas oscilan entre 10^8 y 10^{10} UFC/ml (Acedo & Rico, 1998). Estadísticamente de acuerdo a la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey, se observó que si existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos de temperatura (20°C, 37°C y 45°C) ($F=22.45$, $GL=2$, $P<0.0001$).

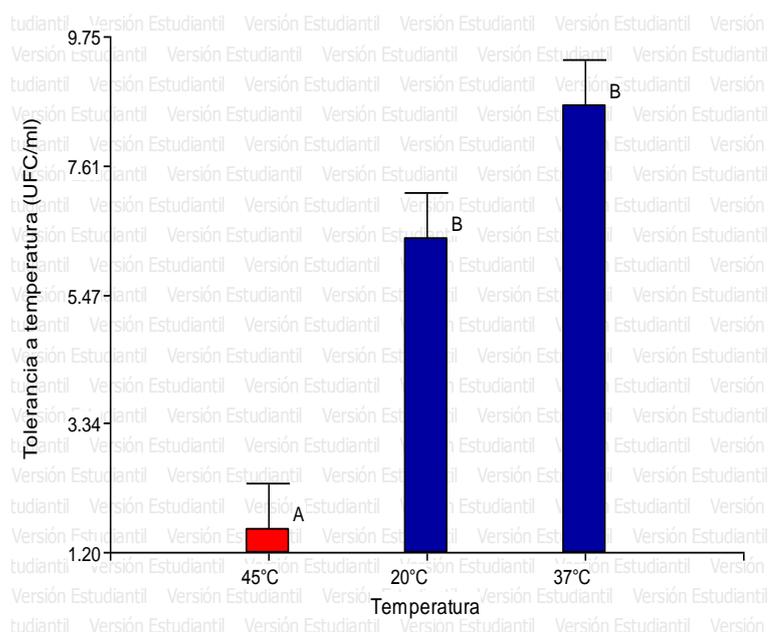


Figura 16. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las bacterias por 10^8 UFC/ml asiladas del intestino de termitas; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con la letra común B no son significativamente diferentes entre si $p>0.05$).

De las 4 bacterias seleccionadas las que mejor resistieron las temperaturas de 20°C y 37°C, fueron las bacterias BDC4, BDC10 y BDC11, incrementando su densidad poblacional, manteniéndose en un promedio de 10^8 UFC/ml, demostrándose así que estas no son susceptibles a la variación de temperatura por debajo del mínimo para un organismo vivo (37°C), mientras que la BDC3 disminuyó hasta 10^4 UFC/ml a la

temperatura de 20°C, lo cual indica que si es susceptible al descenso de temperatura; esta última bacteria (BC3) fue la que mejor resistió la temperatura de 45°C incrementando su densidad poblacional mientras que las otras 3 disminuyeron hasta un promedio de 10^5 UFC/ml, lo cual demostró que si eran susceptibles al incremento de temperatura. Esto quizá pueda deberse a que el género *Escherichia spp.* tienen menor sobrevivencia con respecto a otras bacterias a descensos de temperatura fuera de un organismo vivo que está a 37°C (Romeu, 2012). Mientras que los *Micrococcus spp.*, son bacterias que por lo general viven como microbiota de seres vivos, pero también tienen la característica de vivir sobre la superficie de objetos inanimados, partículas de polvo y suelos, por lo que pueden sobrevivir a distintos cambios de temperatura en especial la ambiental (Sánchez, 2014).

En estudios similares realizados por Lara & Acosta (2013), manifiestan en sus resultados que los bacilos BTN2, BTN7 Y BTN8 que aislaron mantuvieron su crecimiento en concentraciones de 10^8 UFC/ml después de 24 horas de incubación a temperatura de 30°C y 42°C, indicando con ello que sus bacterias no son susceptibles a las variaciones de temperatura en este rango. Sin embargo, el bacilo BTN6, sí presentó un aumento significativo en su crecimiento a 30°C, pasando de una concentración de 10^7 a 10^8 UFC/ml. De igual manera, se observó que esa bacteria no fue capaz de crecer a 42°C, lo cual revela que es muy susceptible a las variaciones de temperatura. Por otro lado García (2010), igualmente aisló 5 cepas de bebidas fermentadas y las puso a prueba bajo diferentes niveles de temperatura (40°C, 50°C y 60°C) de las cuales sus 5 cepas lograron sobrevivir a estos niveles de temperatura evidenciando que si tienen potencial probiótico.

Entre las bacterias, la tolerancia a la temperatura no presentó diferencia estadística significativa ($F= 0.32$; $GL= 3$; $P=0.8093$), por lo que todas las bacterias tienen la capacidad de crecer y resistir la variación de temperaturas ya sea elevándola o disminuyéndola partiendo de un estándar de 37°C. Las bacterias en estudio incrementaron su población en un promedio de 5.53×10^8 UFC/ml, estas bacterias por lo tanto tendrían la capacidad de crecer en el rumen de un animal en el cual su temperatura varía de 38°C a 42°C (Lara, 2005).

Resultados parecidos se dieron en la investigación realizada por Lara & Acosta (2013), donde observaron que al someter bacterias a temperaturas de 30°C y 42°C

lograron sobrevivir, en especial el bacilo BNT6 que fue estadísticamente diferente de los bacilos BTN7 y BTN8; y por otro lado no observó diferencia estadística entre sus bacilos BTN2, BTN7 y BTN8 ($P= 0.067$), todos estos aislados del intestino de termitas. Por otra parte Sánchez *et al.* (2015), evaluó a 17 cepas bacterianas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos, sometidos a 3 rangos de temperatura distintos de (30°C , 37°C y 45°C), donde sus cepas M1, M2, M5, M7, M8, M10, M11, M12, M14, M15, M16, mostraron mayor resistencia incrementando en su densidad poblacional entre 9.3 a $10 \log \text{ UFC/ml}$ siendo estas del tipo bacilo como dos de las bacterias que se reportan en esta investigación.

En la prueba de supervivencia de las bacterias seleccionadas, se observó que no existió diferencia estadística significativa entre las 4 bacterias ($F= 0.50$; $GL= 3$; $P=0.6840$), por lo que todas las bacterias tuvieron un grado de supervivencia similar. Pero aritméticamente se puede decir que la bacteria BDC10 fue la que tuvo un mayor nivel de supervivencia con un promedio de $10.19 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$ (107.5%) con respecto a las otras 3 bacterias.

4.2.2. Prueba a tolerancia a sales biliares

En los tratamientos con sales biliares en concentraciones de 0.6%, 0.3% y 0.0%, estadísticamente se determinó que si existió diferencia significativa ($F=3.71$, $GL=2$, $P=0.0352$) entre los tratamientos, no obstante, al realizar la prueba de Tukey se determinó que las bacterias (BC3, BDC4, BDC10 y BDC11) pueden sobrevivir en cualquiera de las concentraciones de sales biliares ya mencionadas, al no mostrar diferencia estadística significativa (Figura 17).

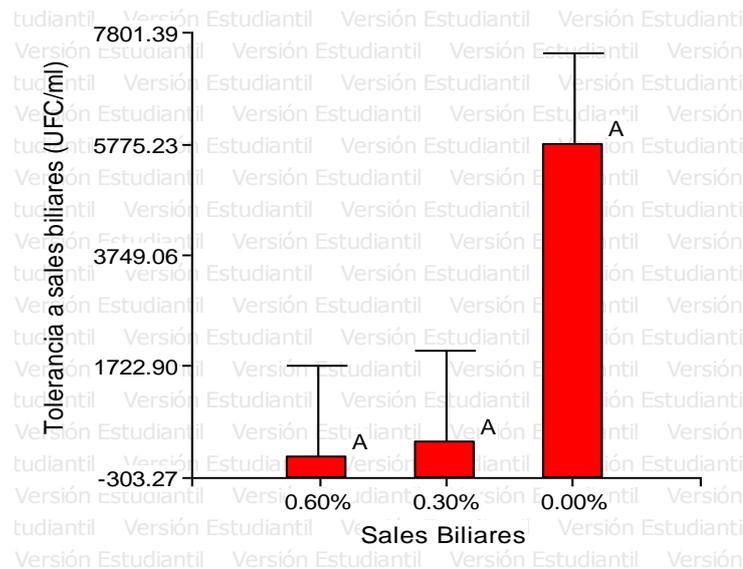


Figura 17. Efecto de las sales biliares sobre el crecimiento de las bacterias intestino de termitas por 10^8 UFC/ml asiladas del; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común A no son significativamente diferentes $p > 0.05$)

Las bacterias BDC4, BDC10 y BDC11 presentaron un incremento significativo en la concentración de UFC/ml luego del periodo de incubación por 24 horas a 37°C , en presencia de sales biliares en concentración de 0.0%, 0.3% y 0.6%, pasando estos de una densidad inicial de 10^8 a 10^{11} UFC/ml en promedio. Mientras que la bacteria BDC3 no tuvo un incremento poblacional significativo en concentraciones de sales biliares de 0.3% y 0.6% siendo este inhibido por completo en estas dos concentraciones, y teniendo sólo un incremento de población de 1.5×10^8 a 5.5×10^8 UFC/ml en promedio en ausencia de las sales.

Estudios realizados por Lara & Acosta (2013), reportaron que las bacterias bacilares que aislaron del intestino de termitas *Nasutitermes nigriceps* lograron resistir concentraciones de sales biliares de 0.0% a 3.0%; Por otra parte Avila *et al.* (2010), describen buenos crecimientos de cepas de *Lactobacillus* aislados de animales de granja en presencia de sales biliares al 0.15%; lo cual indicaría que muchas bacterias tienen potencial para resistir el paso por el tracto intestinal del animal e incluso multiplicarse y aumentar su densidad poblacional que según Acedo & Rico (1998) estas deben incrementar su población de 10^7 a 10^8 UFC/ml, para que se encuentran dentro de los valores habituales establecidos para microorganismos probióticos.

Luego de realizar el análisis estadístico de ANOVA ($F= 4.14$; $GL= 3$; $P=0.0137$) y prueba de Tukey, se determinó que el aumento de la densidad bacteriana vario estadísticamente, siendo el que mejor tolero las sales biliares la bacteria BDC11 ya que incrementó su densidad bacteriana en un promedio de 76.64×10^{10} UFC/ml, seguido por las demas bacterias BDC10, BDC4 y BC3 respectivamente (Figura 18), que no presentaron diferencia estadística significativa entre si, lo cual permitió establecer que si existe diferencia entre el crecimiento en ausencia y presencia de sales biliares para cada bacteria.

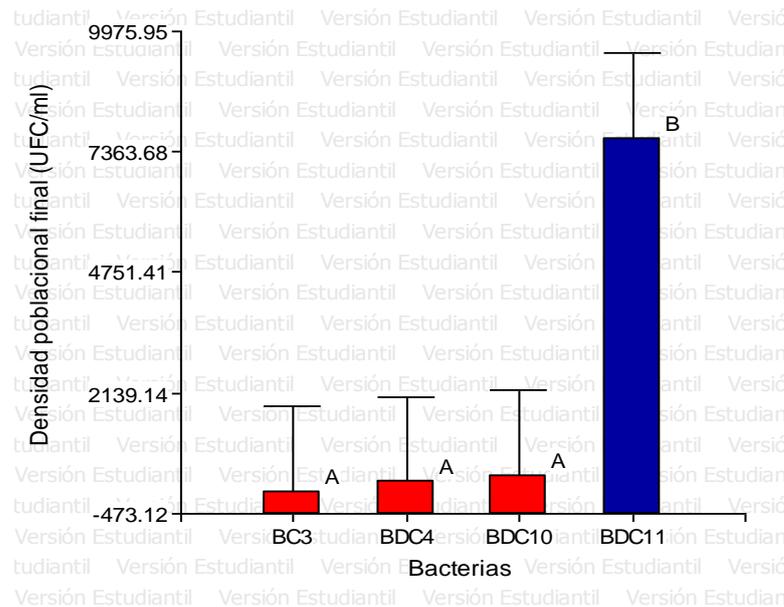


Figura 18. Densidad poblacional final de bacterias tolerantes distintas concentraciones de sales biliares por 10^8 UFC/ml asiladas del intestino de termitas; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común A no son significativamente diferentes entre sí $p>0.05$).

En cuanto al porcentaje de supervivencia si existió diferencia estadística significativa entre las bacterias ($F= 24.63$; $GL= 3$; $P<0.0001$). Al realizar la prueba de Tukey se observó que no existió diferencia significativa entre las bacterias BDC11, BDC10 y BDC4 que sí tuvieron porcentajes de supervivencia mayores al 100% (135.28; 127.54; 124.28% en promedio respectivamente) incrementando su densidad poblacional en presencia de las sales biliares, pero estas si fueron estadísticamente diferentes a la bacteria BC3 que no tuvo un incremento significativo, incluso disminuyó su población obteniendo solo un 40.93% de supervivencia en promedio (Figura 19).

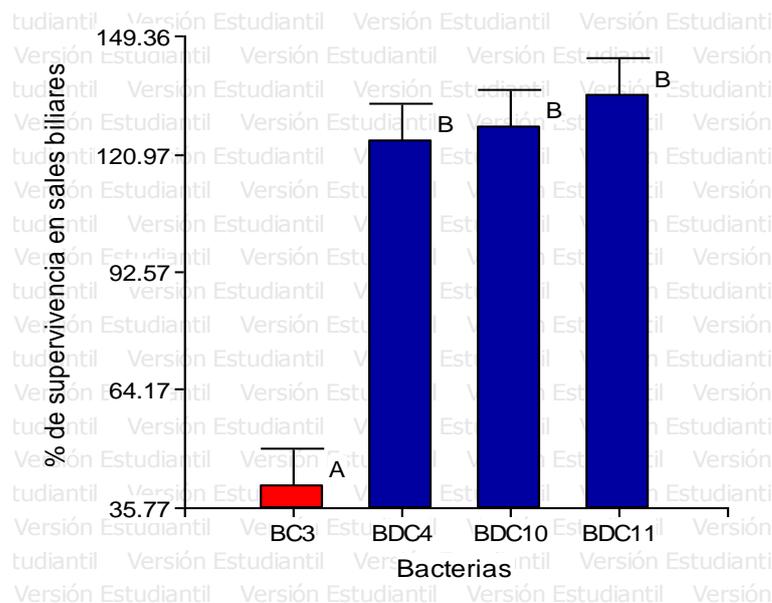


Figura 19. Porcentaje de supervivencia las bacterias asiladas del intestino de termitas; a distintas concentraciones de sales biliares; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común B no son significativamente diferentes $p > 0.05$).

Estos resultados son similares a los obtenidos por Lara & Acosta (2013), quienes observaron que las bacterias que aislaron del intestino de termitas tienen un comportamiento inversamente proporcional entre el crecimiento de las bacterias y las concentraciones de sales biliares que ellos emplearon (0.0%, 0.05%, 0.15% y 0.30%), y de que si existió diferencia significativa en su ensayo ($P < 0.017$), estableciendo que si existe diferencias entre los crecimientos en ausencia y presencia de sales biliares. Por otro lado Amorocho (2011), describe que las bacteria que se incorporen al organismo vivo de un animal deben resistir a las sales biliares y la pancreatina que están presentes en el intestino donde estas bacterias deben sobrevivir en este tramo durante 1 a 4 horas, incluso 6 horas. Mientras que Cueto & Aragón (2012), mencionan que de sus 53 cepas aisladas, 29 lograron tolerar una exposición a las sales biliares en concentración de 0.3% y obteniendo un promedio de supervivencia de sus bacterias del 54% y 63%.

4.2.3. Prueba de tolerancia al Cloruro de Sodio (NaCl)

Estadísticamente en esta prueba se observó que si existió diferencia estadística entre los tratamientos ($F=100.45$, $GL=2$, $P < 0.0001$), en donde las bacterias tuvieron un mejor desarrollo en ausencia del NaCl, y también al 4% de este, pero no tuvieron un buen desarrollo en concentración de 8% (Figura 20).

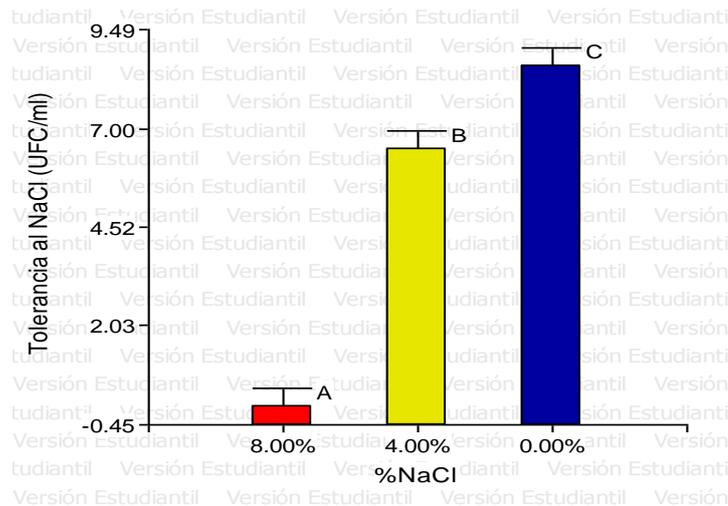


Figura 20. Efecto del cloruro de sodio (NaCl) sobre el crecimiento de las bacterias aisladas del intestino de termitas por 10^8 UFC/ml; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con letras distintas A, B y C son significativamente diferentes $p < 0.05$).

La bacteria BDC10 tuvo mayor resistencia a los distintos niveles de NaCl (0%, 4% y 8%) donde incremento su densidad poblacional en 6.10×10^8 UFC/ml con respecto a las otras, que solo tuvieron un incremento poblacional de 4.6×10^8 UFC/ml en promedio de las tres restantes luego de las 24 horas de incubación. En concentración de NaCl al 8% p/v se puede observar que todas las bacterias disminuyeron su densidad población sin excepción de 10^8 a 10^5 UFC/ml, mientras que la bacteria BC3 fue la que menos pudo tolerar la alta concentración de NaCl, lo cual puede deberse a que esta última pertenece al género *Escherichia spp.* que se conoce por su alta mortandad en ambientes que no sean sus favorables (Romeu, 2012).

Al realizar las pruebas estadísticas de análisis de varianza, se determinó que no existe diferencia estadística significativa entre las bacterias ($F=0.74$; $GL=3$; $P=0.5387$), pero aritméticamente si se logró observar una diferencia entre las bacterias donde la bacteria BDC10 tuvo el mayor promedio de crecimiento con respecto a las otras 3 en especial la BDC4 que tuvo el mas bajo promedio de aumento de su población.

Parecidos resultados fueron reportados por Lara & Acosta (2013) quienes lograron encontrar que a pesar de las diferencias poblacionales observadas de sus bacterias, el análisis de varianza para su estudio reveló que no existía diferencia significativa entre los crecimientos de sus bacilos estudiados, en cada una de las concentraciones de NaCl ensayados por ellos (0, 2, 5 y 10%), ya que el valor P (0.347) fue mayor

que 0.05. Por otro lado Sánchez *et al.* (2015) colocó 5% del concentrado celular que aisló del intestino de terneros neonatos a 10 ml de jugo gástrico artificial que contenía 2g/l de NaCl, para comprobar que efectivamente estas bacterias pueden resistir tales concentraciones y así lograr atravesar la barrera fisiológica del tracto digestivo e incluso poder multiplicarse en estas condiciones.

En la prueba estadística para el porcentaje de supervivencia se logró observar que no hubo diferencia estadística entre las 4 bacterias ($F=0.10$; $GL=3$; $P=0.9612$), pero sí que la bacteria BDC10 tuvo un mayor grado de supervivencia con un promedio de 95.45%, seguida de las otras bacterias BDC11, BC3 y BDC4 con 93.41%, 91.68% y 98.68% de supervivencia respectivamente.

4.4.4. Prueba de tolerancia distintos niveles de pH

Estadísticamente con la prueba de ANOVA y de Tukey, para los tratamientos de pH en niveles de 5, 6 y 7, se observó que no existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($F=2.71$, $GL=2$, $P=0.0813$), pero sí es relevante que aritméticamente, todas las bacterias presentaron un crecimiento exponencial con un pH de 6 y no con el de 7 como se esperaba (Figura 21). Lo cual pueda deberse a que al ser aisladas del intestino de termitas estas están acostumbradas a vivir en un pH de esa magnitud, ya que el intestino de la termita está en constante acidez para poder digerir la celulosa que ingiere (Martínez *et al.*, 2009).

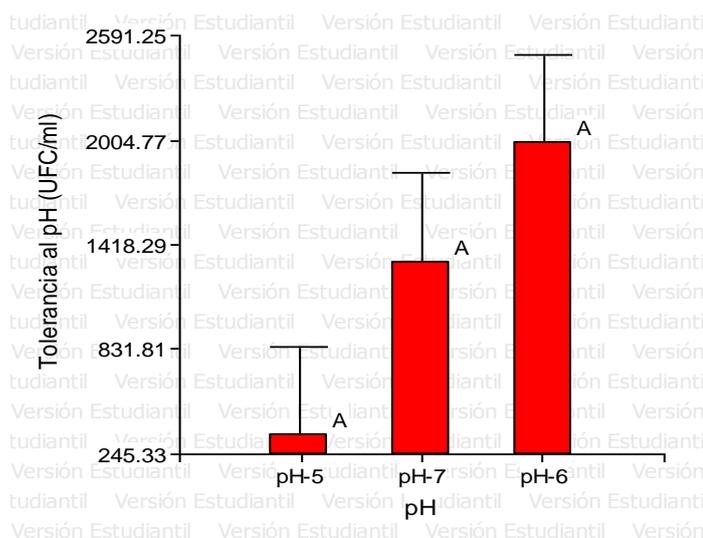


Figura 21. Efecto del pH sobre el crecimiento de las bacterias aisladas del intestino de termitas por 10^8 UFC/ml; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común A no son significativamente diferentes $p>0.05$).

La bacteria BDC10 tuvo una mayor resistencia a los distintos niveles de pH a los que se les colocó (5, 6 y 7), teniendo un promedio de 33.71×10^8 UFC/ml de incremento en su densidad poblacional con respecto a las otras bacterias. Este dato es muy importante ya que con él podemos decir que las bacterias aisladas en esta investigación son capaces de superar las barreras fisiológicas de los animales, como por ejemplo de los rumiantes que su pH del rumen oscila entre 5.8 y 7.0 (Van Lier & Regueiro, 2008), e incluso aumentar su población sin ser inhibidos.

Estadísticamente se logró demostrar que existe diferencia estadística significativa ($F=11.54$; $GL=3$; $P<0.0001$), en donde la bacteria BDC10 fue la que mejor resistió los distintos niveles de pH frente a las otras bacterias que no fueron estadísticamente diferentes entre sí (Figura 22).

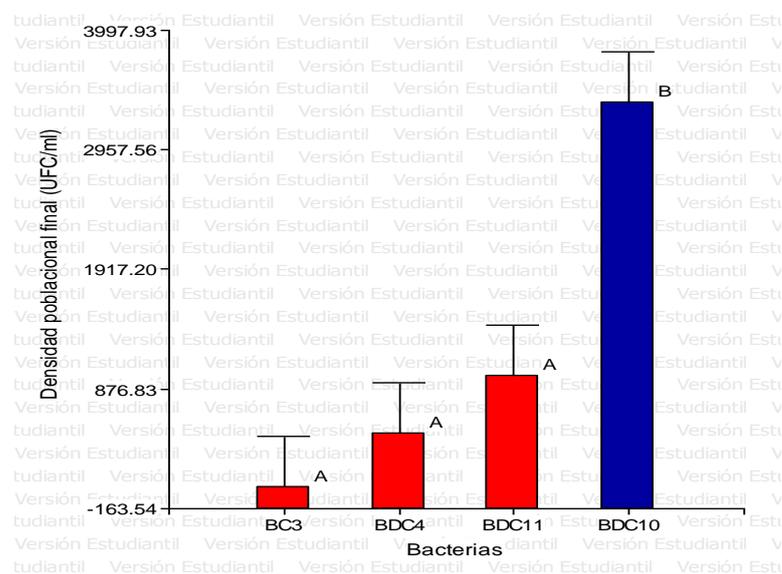


Figura 22. Densidad poblacional final de bacterias aisladas del intestino de termitas tolerante a distintos niveles de pH por 10^8 UFC/ml; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común A no son significativamente diferentes $p>0.05$).

En estudios parecidos realizados por Ortiz & Reuto (2007), en donde realizaron pruebas probióticas a dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, a las que pusieron en niveles distintos de pH (2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 y 5), apreciaron que esta levadura logró resistir estos niveles de pH pero sin existir diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre las dos cepas, mas ambas mantuvieron un incremento logarítmico de 10^6 UFC/ml en todos los niveles de pH que evaluaron, por otra parte Sánchez *et al.* (2015) puso a prueba a bacterias que aisló de terneros neonatos a niveles de pH de

2.5, 3, 4, 5.4 y 6.4; en donde observó que 6 cepas de 10 fueron capaces de resistir estos niveles de pH, con un crecimiento logarítmico de 2,2 a 2,9; comprobando así que sus cepas eran capaces de traspasar la barrera fisiológica de la acidez del estomago, mientras que Lara & Acosta (2013) también pusieron a sus bacilos aislados del intestino de termitas frente a niveles de pH (4, 5, 7), en lo cual observaron que el bacilo BTN6 a diferencia de sus otros bacilos BTN2, BTN7 y BTN8, presentó un incremento en la magnitud de su densidad poblacional pasando de 10^7 a 10^8 UFC/ml en medios con pH 5 y pH 7, pero estadísticamente no encontró diferencia estadística significativa entre sus bacilos ya que el valor P (0.380) que halló fue mayor a 0.05.

Al realizar la prueba estadística para el porcentaje de supervivencia se pudo apreciar de que si existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($F=11.54$, $GL=3$, $P<0.0001$), en donde las bacterias BDC10, BDC11 y BDC4 tuvieron el mayor porcentaje, pero siendo entre estos la BDC10 la mayor con un promedio del 137.15% de supervivencia, a diferencia de las otras, mientras que la BC3 fue la que menor resistencia tuvo con tan solo 105.06% de supervivencia siendo esta estadísticamente diferente a las otras (Figura 23).

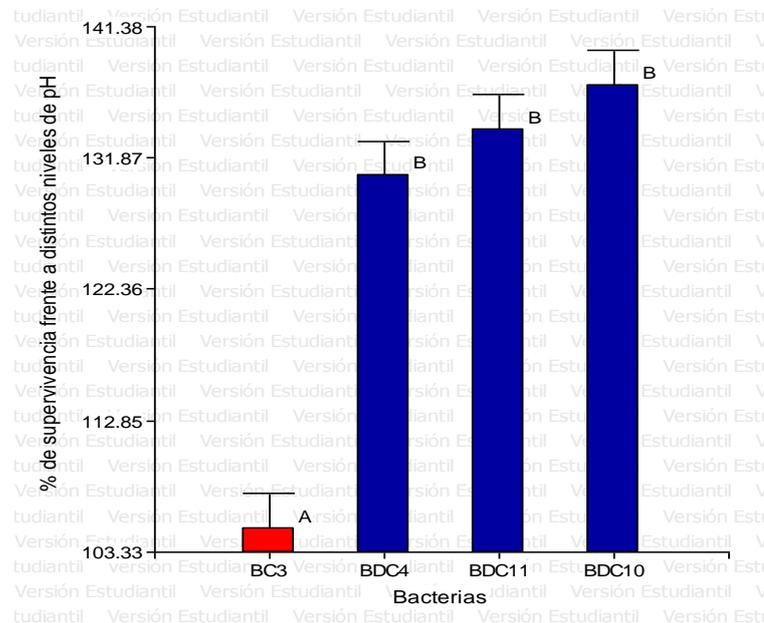


Figura 23. Porcentaje de supervivencia de bacterias aisladas del intestino de termitas frente a distintos niveles de Ph; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común B no son significativamente diferentes $p>0.05$).

4.4.5. Pruebas de antagonismo

En esta prueba se pudo observar que no existió antagonismo inhibitorio frente a la bacteria *Escherichia coli* por parte de las cepas bacterianas aisladas (Tabla 8), pero si se pudo observar de que estas compitieron por el espacio con la bacteria patógena sin dejarse inhibir, por lo que estas pueden actuar de igual manera dentro del tracto intestinal del animal compitiendo por sitios de anclaje que es una de las características probióticas que se debe tener en cuenta para decir que una bacteria es o no probiótica (Lara, 2005).

Resultados parecidos obtuvieron Lara & Acosta (2013), quienes en los ensayos de antagonismos con sus bacilos aislados de termitas, observaron que sus colonias de bacterias BTN2 y BTN2 solo tuvieron un halo de inhibición frente a *Escherichia coli* de 2mm de diámetro, y la BTN6 y BTN7 solo 3 mm, lo cual lo interpretaron como diferencias poco relevantes, por otra parte Benavides (2016) evaluó la capacidad antibacteriana de cepas bacterianas comerciales frente *E. coli* donde logró encontrar que estas inhibieron al patógeno formando halos de 1mm, en distintos tiempos de incubación, lo cual no es un rango muy insignificativo pero que si compitieron por el espacio lo cual es importante para una bacteria probiótica, tal cual se encontró en esta investigación.

Tabla 8. Prueba de antagonismo de las cepas bacterianas seleccionadas frente a *Escherichia coli*; Puno, Abril a Junio del 2017.

Rotulo	Tratamiento	Halo de inhibición en mm
BC3	Control negativo (Agua estéril)	10.0
	Control positivo (Ciprofloxacino)	28.2
	R1 (1.5×10^8 UFC/ml)	11.0
	R2 (1.5×10^8 UFC/ml)	11.0
	R3 (1.5×10^8 UFC/ml)	11.0
BDC4	Control negativo (Agua estéril)	10.0
	Control positivo (Ciprofloxacino)	30.1
	R1 (1.5×10^8 UFC/ml)	11.0
	R2 (1.5×10^8 UFC/ml)	10.0
	R3 (1.5×10^8 UFC/ml)	10.0
BDC10	Control negativo (Agua estéril)	10.0
	Control positivo (Ciprofloxacino)	29.5
	R1 (1.5×10^8 UFC/ml)	10.0

	R2 (1.5x10 ⁸ UFC/ml)	10.0
	R3 (1.5x10 ⁸ UFC/ml)	10.0
	Control negativo (Agua estéril)	10.0
	Control positivo (Ciprofloxacino)	27.0
BDC11	R1 (1.5x10 ⁸ UFC/ml)	11.0
	R2 (1.5x10 ⁸ UFC/ml)	10.0
	R3 (1.5x10 ⁸ UFC/ml)	10.0

Los posos excavados para la prueba midieron 1cm (10 mm) por lo tanto halos iguales a 10 mm son iguales a que no existió inhibición.

4.3. Determinación del potencial de las bacterias celulolíticas mediante tiempos de degradación de la totora (*Schoenoplectus tatora*) en condiciones controladas

4.3.1. Prueba de los azúcares reductores por el método DNS

En esta prueba se pudo observar como las bacterias liberaban azúcares reductores (glucosa) al medio de cultivo luego de tiempos de incubación, donde se observó que estas producían gas en las primeras 24 y 48 horas, cesando a las 72 horas en todas las bacterias. La producción de gas puede estar relacionado a que las bacterias pueden ser productoras de gas metano e hidrógeno (Lara & Acosta, 2013), ya que al ser aisladas del intestino de las termitas estas tendrían la capacidad de producir dichos gases por un proceso fermentativo, y se sabe que en presencia de glucosa las bacterias del genero *Escherichia spp.* como lo es la BC3 son productoras de gas y esta es una característica para ser identificada (Romeu, 2012).

La bacteria BC3 y BDC10 tuvieron la mayor producción de azúcares reductores con un promedio de los tres tiempos de incubación de 0.20 g/l seguidos por la BDC4 con un promedio de 0.18 g/l y finalmente la BDC11 solo con un promedio de 0.13 g/l, siendo a las 72 horas donde se observó la mayor producción de azúcares reductores por las bacterias. Esta producción de azúcares se debe principalmente al ataque de enzimas específicas que producen estas bacterias para actuar sobre la celulosa y la hemicelulosa como la β -1,4 glucanasa (Zhang *et al.*, 2006), y así romper los enlaces β -1,4 glucosídico y de esta manera dejar libres a las moléculas de glucosa (Gaitan & Lara, 2007). Esta glucosa liberada luego puede ser asimilada fácilmente por los animales para ser convertida posteriormente en ácidos grasos volátiles (AGV) fundamentales para los animales en especial los rumiantes (Lara & Acosta, 2013).

No obstante estadísticamente luego de realizar la prueba ANOVA y prueba de Tukey a los 3 tiempos de incubación, se pudo observar que a las 24 horas si existió diferencia estadística significativa en la producción de azúcares reductores ($F=87.20$, $GL= 3$, $P<0.0001$), donde la bacteria BDC10 y BDC4 tuvieron un promedio de 0.07 g/l siendo las mejores y estadísticamente diferentes a las bacterias BDC11 y BC3, que tuvieron promedios de producción de azúcares reductores de 0.05 y 0.01 g/l respectivamente (Figura 24). Lo cual pueda deberse a que las bacterias requieren mas tiempo para digerir y liberar los azúcares reductores hacia el medio (Lara, 2005).

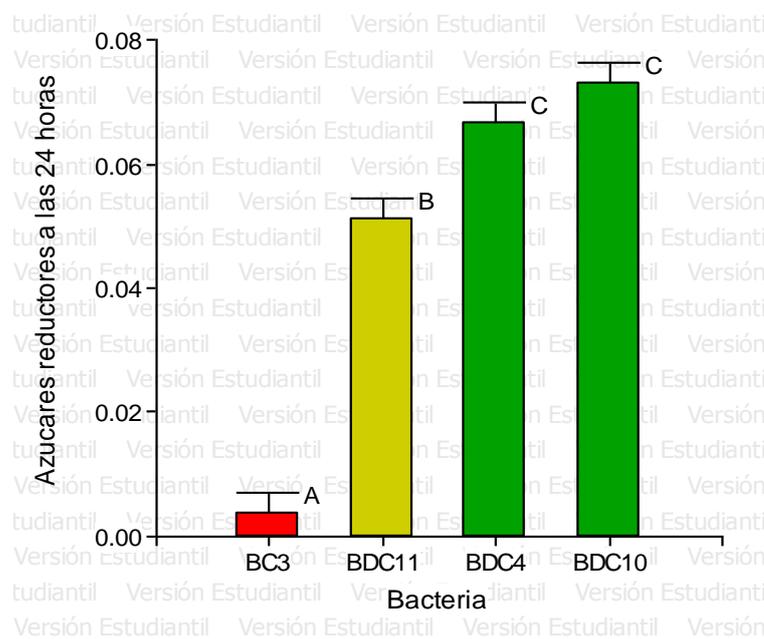


Figura 24. Azúcares reductores producidos por las bacterias aisladas del intestino de termitas a las 24 horas de incubación; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra distinta A, B y C son significativamente diferentes $p>0.05$).

A las 48 horas se observó que también hubo diferencia estadística ($F=18.10$, $GL=3$, $P=0.0006$), en donde la bacterias BDC10 siguió liderando la producción de azúcares reductores con un promedio de 0.13 g/l junto esta vez a la bacteria BDC11 con 0.15 g/l de producción de azúcares reductores, siendo estadísticamente diferentes a las BC3 (0.10 g/l) y BDC4 (0.09 g/l) quienes no presentaron diferencia estadística (Figura 25).

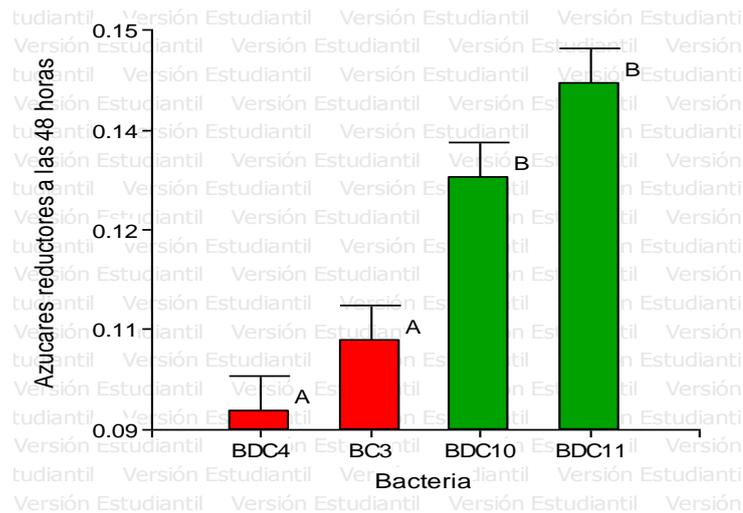


Figura 25. Azúcares reductores producidos por las bacterias aisladas del intestino de termitas a las 48 horas de incubación; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común A o B no son significativamente diferentes $p > 0.05$).

Finalmente en el ultimo tiempos de incubación a las 72 horas se obtuvo un resultado estadísticamente significativo ($F=17.57$, $GL=3$, $P=0.0007$), en donde las bacterias BC3 (0.49 g/l), BDC10 (0.39 g/l) y BDC4 (0.39 g/l) fueron las mejores en producir azúcares reductores respectivamente, siendo estas 3 estadísticamente diferente a las BDC11 (0.18 g/l) que no aumento significativamente su producción de azúcares reductores en comparación con el tiempo de incubación de 48 horas (Figura 26).

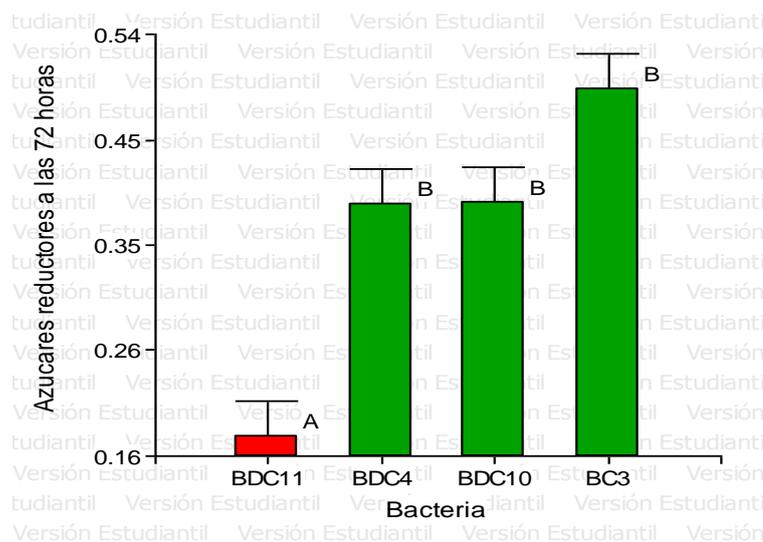


Figura 26. Azúcares reductores producidos por las bacterias aisladas del intestino de termitas a las 72 horas de incubación; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común B no son significativamente diferentes $p > 0.05$).

Al realizar la prueba estadística para ver en cual de los tiempos de incubación se produce mas azúcares reductores se logró ver que es a las 72 horas donde se produce más liberación de estos azúcares por parte de las bacterias, con un promedio de 0.36 g/l, existiendo diferencia estadística ($F=54.87$, $GL=2$, $P<0.0001$) entre este tiempo con los otros dos de 24 (0.05 g/l) y 48 horas (0.12 g/l) que no fueron significativamente diferentes entre si (Figura 27).

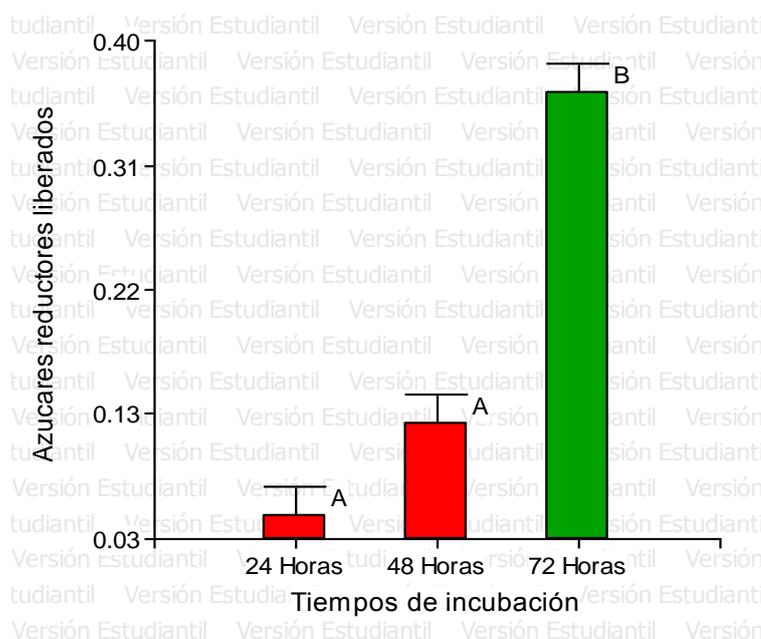


Figura 27. Azúcares reductores producidos por las bacterias aisladas del intestino de termitas en 3 tiempos distintos de incubación; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común A no son significativamente diferentes $p>0.05$).

Los resultados encontrados son comparables con los reportados por Lara & Acosta (2013), quienes al evaluar sus bacterias degradadoras de celulosa en la degradación del pasto, no encontraron diferencia estadística significativa ($P=0.956$) en la producción de azúcares reductores, pero si aritméticamente una de sus bacterias la BTN8 logró producir más azúcares reductores liberándolas a su medio de cultivo, mientras que Bello *et al.* (2006) nos reafirma la utilidad del método DNS para la identificación de azúcares reductores al haber el encontrado con este método 154,3 g/L de azúcares reductores en extracto de caña de azúcar.

4.3.2. Prueba de digestibilidad de la totora

Con esta prueba se logró determinar que las bacterias aisladas tienen la capacidad suficiente para digerir la totora, ya que en los tres tiempos de incubación se observó

como el porcentaje de digestibilidad se incrementaba conforme pasaba el tiempo. Al realizar las pruebas estadísticas de ANOVA y prueba de Tukey para estos tiempos de incubación se determinó que si existe diferencia estadística ($F=26.17$, $GL=2$, $P<0.0001$), donde los mejores tiempos de digestibilidad son de 48 y 72 horas con promedios de 19.38% y 22.25% respectivamente, los cuales no son estadísticamente diferentes, pero si son distintos al tiempo de 24 horas con un promedio de solo 12.63% de digestibilidad (Figura 28).

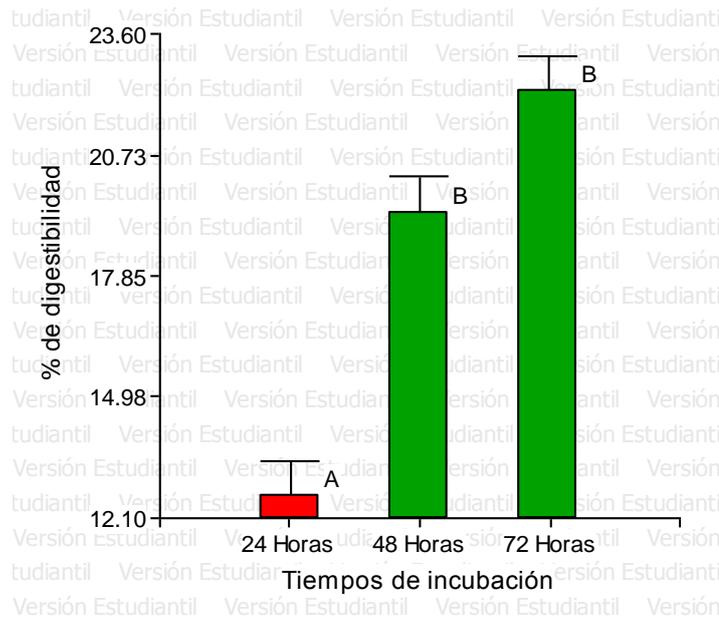


Figura 28. Porcentaje de digestibilidad producidos por las bacterias aisladas del intestino de termitas en 3 tiempos distintos de incubación; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común B no son significativamente diferentes $p>0.05$).

No obstante las bacterias mostraron un compartamiento distinto en cada tiempo de incubación. A las 24 horas se pudo observar estadísticamente que si existió diferencia ($F=4.45$, $GL=3$, $P=0.0405$), en la que la bacteria que mejor digirió la totora fue la BDC11 con un promedio de 15.50%, mientras que las otras bacterias BDC10, BDC4 y BC3 solo tuvieron un porcentaje de digestibilidad en promedio de 13.5%, 11.5% y 10.5% respectivamente (Figura 29).

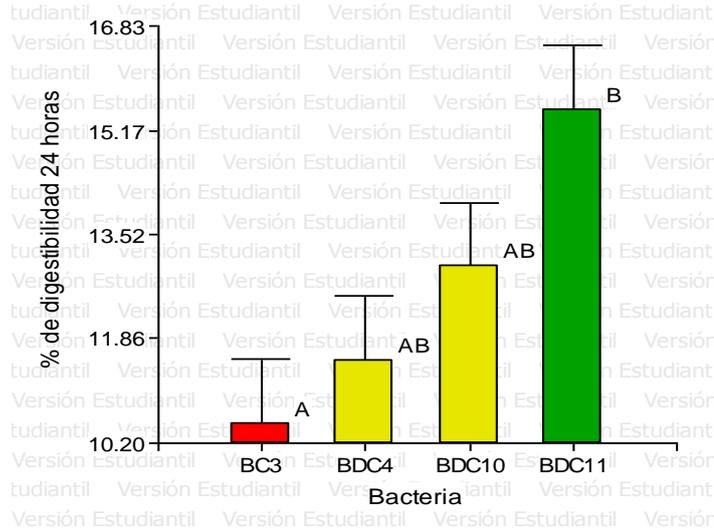


Figura 29. Porcentaje de digestibilidad de la totora producidos por las bacterias aisladas del intestino de termitas a las 24 horas de incubación; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común A o B no son significativamente diferentes $p>0.05$).

A las 48 horas se observó también diferencia estadística entre las bacterias ($F=6.29$, $GL=3$, $P=0.0169$), donde las bacterias que lograron digerir mejor la totora fueron la BC3 y BDC11 con un promedio de 23% y 21% de digestibilidad respectivamente, mientras que la BDC10 fue la que tuvo el más bajo nivel de digestibilidad de tan solo 13.5%, pero con un ligero incremento a comparación de las 24 horas (Figura 30).

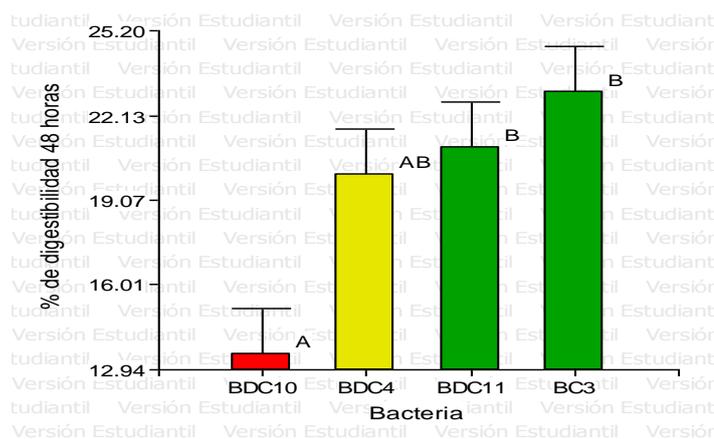


Figura 30. Porcentaje de digestibilidad de la totora producidos por las bacterias aisladas del intestino de termitas a las 48 horas de incubación; Puno, Abril a Junio del 2017 (medidas con una letra común A o B no son significativamente diferentes $p>0.05$).

Finalmente a las 72 horas se pudo observar estadísticamente de que no existió diferencia estadística ($F=3.13$, $GL=3$, $P=0.0876$), por lo que todas las bacterias tuvieron un incremento en su porcentaje de digestibilidad sin mostrar diferencia, por lo que a este tiempo todas las bacterias tuvieron el mismo poder de digestibilidad sobre la totora, sin embargo aritméticamente se observa que la bacteria BC3 es la mejor en digerir la totora con un promedio de 24% de digestibilidad, seguido por la BDC11 y BDC4 con promedios de 23.5% y 22.5% respectivamente, y por último la BDC10 con 19% de digestibilidad.

Resultados parecidos fueron reportados por Lara & Acosta (2013), que luego de someter a las pruebas probióticas a las bacterias que aislaron del intestino de termitas, las pusieron a prueba para digerir el pasto maralfalfa (*Pennisetu spp.*), en la cual observaron que estas tuvieron un incremento en la digestibilidad a las 24 y 48 horas de incubación de este junto a las bacterias, siendo la BTN8 la más eficiente en su investigación con un porcentaje de 36.10%, mientras que a las 72 horas estas disminuyeron su actividad degradadora, por otro lado estos resultados son inferiores a los reportados por Clavero & Razz (2009) quienes al realizar pruebas de digestibilidad sobre *Pennisetum spp.* con bacterias aisladas del rumen de ganado vacuno, encontraron porcentajes de digestibilidad de 52.1% y 62.54%, no obstante los resultados obtenidos son superiores a los reportados por Grillo *et al.* (2011), quienes obtuvieron porcentajes de digestibilidad de celulosa en alfalfa de tan solo 19.10% con una cepa de *Fibrobacter succionógenes*.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede afirmar que la bacteria BDC11 (*Micrococcus spp.*) y BDC10 (*Enterobacter spp.*) encontradas en este estudio son las que mejor lograron hidrolizar la celulosa y también las mejores en lograr superar las pruebas probióticas y de degradación de la totora por lo que son las candidatas principales para realizar pruebas de campo en animales, lo cual beneficiaría enormemente a estos ya que al ser probióticos regularizarían mejor el tracto intestinal, y brindarían al animal mayor porcentaje de digestibilidad (Soto, 2001). Mejorando así la calidad de los productos que estos ofrecen como la carne y la leche con todos sus derivados, como también mejorando su sistema inmune ya que estos tienen dicha capacidad para ello, protegiendo así al animal de infecciones por otro tipo de bacterias patógenas ya sea compitiendo por los lugares de anclaje o produciendo sustancias bactericidas (Boga & Gorgulu, 2007). Estas bacterias

probióticas también tendrían una gran utilidad en el ámbito industrial ya que lograrían que el animal gane peso más rápidamente mejorando la calidad de estos en el mercado (García *et al.*, 2012).

La producción igualmente de azúcares reductores es muy importante en este sentido ya que con la glucosa que es el principal azúcar que se libera luego de la degradación de la celulosa, el animal puede producir aminoácidos y realizar las funciones vitales de cada una de sus células ya que este monosacárido es la fuente principal de energía de los seres vivos (Castro & Rovetto, 2006).

Por ende las bacterias del intestino de termitas si tienen capacidad celulolítica y demostraron tener características probióticas al superar las pruebas a las que fueron sometidas, cómo también ser eficaces en la liberación de azúcares reductores y en la degradación de la totora, por lo tanto se acepta la hipótesis alterna.

V. CONCLUSIONES

De las bacterias que habitan el intestino de las termitas (*Nasutitermes longinasus*) que fueron colectadas en la ciudad de Massiapo capital del distrito de Alto Inambari, distrito de Sandia de la región Puno, se logró aislar 24 bacterias con poder celulolítico, de las cuales las mejores fueron las bacteria *Escherichia spp.* (BC3), *Micrococcus spp.* (BDC4), *Enterobacter spp.* (BDC10) y *Micrococcus spp.* (BDC11) quienes tuvieron los mayores halos de hidrólisis de la celulosa (10.5, 10.7, 12.3 y 11.7mm respectivamente).

Las bacterias seleccionadas (BC3, BDC4, BDC10 y BDC11) tienen características probióticas suficientes como para tolerar distintos niveles de temperatura (20°C, 37°C y 45°C), sales biliares (0.0%, 0.3% y 0.6%), cloruro de sodio (0%, 4% y 8%), pH (5,6 y 7) y también tener características de antagonismo, siendo más eficaces las bacterias *Micrococcus spp.* (BDC11) y *Enterobacter spp.* (BDC10) lo cual sigue que estas tienen la capacidad suficiente para adaptarse con facilidad al rumen o tracto gastrointestinal de los animales y proveerles así los beneficios de una bacteria probiótica.

La capacidad de digestión sobre la totora de estas bacterias, en los tiempos de incubación de 24, 48 y 72 horas, demostraron ser muy eficientes tanto digiriendo la totora como liberando azúcares reductores al medio (glucosa), donde la bacteria *Escherichia spp.* (BC3) fue la que tuvo el porcentaje de digestibilidad más alto de 23%, y la mejor cantidad de azúcares reductores liberados (0.49 g/l) en un tiempo de 72 horas, con lo cual se demostró que estas bacterias son eficientes para este propósito y tendrían un alto rendimiento como suplemento para animales de producción vacuna, ovina y camélida.

VI. RECOMENDACIONES

Realizar más investigación a las bacterias que habitan el intestino de las termitas de distintas especies, ya que muchas de ellas no poseen el mismo hábitat ni el mismo tipo de alimentación y por ende poseen otro tipo de microbiota.

Identificar a las bacterias con los más altos niveles de hidrólisis de la celulosa mediante pruebas más avanzadas como las moleculares, con el fin de llegar hasta la especie, y de esta manera tener un mejor conocimiento científico de estas.

Realizar más pruebas probióticas a las bacterias que se aíslan y seleccionen para este fin, para tener así mayor nivel de confianza, competitividad y calidad, con lo cual se podrán realizar pruebas *in situ* con animales vivos.

Poner a prueba a estas bacterias con distintas plantas forrajeras, para demostrar su potencial en digerir distintos sustratos vegetales y también cuantos azúcares reductores producen con cada tipo de planta.

VII. REFERENCIAS

- Acedo, J., & Rico, G. (1998). Utilización de aditivos en piensos para rumiantes: minerales forma orgánica, levaduras, enzimas, ionóforos y otros. Producción Animal.
- Alcivar, M., & Vera, V. (2013). Aislamiento de bacterias celulolíticas a diferentes profundidades en plantación de teca (*Tectona grandis*) y pechiche (*Vitex gigantea*). Calceta: Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "MANUEL FÉLIX LÓPEZ".
- Alexander, M. (1980). Introducción a la microbiología del suelo. México: AGT Editor, S.A.
- Amorocho, C. M. (2011). Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra. Valencia: Universitat Politècnica de Llevant.
- Avalos, L. (2015). Suplementación de concentrado fibroso con inclusión de heno de totora (*Schoenoplectus tatora*) en la alimentación de vacas lecheras al pastoreo. Puno: Universidad Nacional del Altiplano.
- Avila, J., Avila, M., Tovar, B., Brizuela, M., Perazo, Y., & Hernández, H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. Revista Científica, 161-169.
- Bacton, Dickinson and Company. (2005). Patrón de turbidez BBL preparado: McFarlam Turbidity Standard N° 0.5. USA: Dickinson and Company.
- Bailey, & Scott. (2003). Diagnóstico Microbiológico. New York: Medica Panamericana.
- Barrera, C., Carlosama, P., & Flores, P. (2009). Aislamiento, selección y preservación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales en compost generados en un cultivo de crisantemo. Universidad Central de Ecuador.
- Bello, D., Carrera, E., & Díaz, Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 44-50.

- Benavides, A. B. (2016). Determinación de la capacidad antimicrobiana y susceptibilidad a los antibióticos de cepas bacterianas ácido lácticas con posible potencial. Ibarra: Universidad Técnica del Norte.
- Bhat, M. (2000). Cellulases and related enzymes in Biotechnology. *Biotechnology Advances*, 355-383.
- Boga, M., & Gorgulu, M. (2007). Efecto de probióticos basados en *Lactobacillus sp.* y *Lactobacillus sp.* más levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en el rendimiento y la composición de la leche de vacas lecheras. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 323-327.
- Canessa, E. (2006). Las termitas: un enemigo silencioso. Kurú: *Revista Forestal*, 1-5.
- Castro, L. A., & Rovetto, C. (2006). Probióticos: utilidad clínica. *Colombia Médica*, 308-314.
- CDC, & OMS. (2009). Medios, reactivos y control de calidad. *Medicina & Laboratorio*, 549-587.
- Clavero, T., & Razz, R. (2009). Valor nutritivo del pasto maralfalfa (*Pennisetum purpureum* y *Pennisetum glaucum*) en condiciones de defoliación. *Revista Facultad de Agronomía*, 78-87.
- Collot, D. (1980). Lecs macrophytes de quelques lacs andins. La Paz: Convenio Universidad Mayor de San Andres.
- ControlSAC. (2015). Termitas. Lima: Control SAC 2015.
- Cueto, C., & Aragón, S. (2012). Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol in vitro. *Scientia Agropecuaria*, 45-50.
- Cueto, M., Acuña, Y., & Valenzuela, J. (2010). Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suelo costeño. *Revista Colombiana Actual Biol*, 129-138.
- Dejoux, C., & Iltis, A. (1991). El Lago Titicaca: Síntesis del conocimiento limnológico actual. La Paz: ORSTOM.
- Escalona, R. (2012). Punción aspirativa con aguja fina para el diagnóstico de tumores en anatomía patológica. *MEDISAN*, 247-258.

- Fajardo, E., & Sarmiento, S. (2007). Evaluación de Melaza de Caña como Sustrato para la Producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- FAO, & OMS. (2006). Probióticos en los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Gaitan, D., & Lara, C. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Gaju, M., Bach, C., & Molero, R. (2015). Orden Isoptera. Ibero Diversidad Entomológica @ccesible, 1-17.
- Gaju, M., Notario, R., Mora, E., Alcaide, T., Moreno, R., & Molero, C. (2002). Termite Damage to Buildings in the Province of Córdoba. *Sociobiology*, 75-85.
- Galiano, J. (1987). Productividad primaria de la totora (*Scirpus tatora* Khunt), en el lago Titicaca, Sector Puno. Puno: Universidad Nacional del Altiplano.
- Galina, M. A., Delgado, M., Ortíz, M. A., Pineda, L. J., & Puga, D. C. (2009). Cinética ruminal y crecimiento de cabritos suplementados con un probiótico de bacterias ácido-lácticas. *Pastos y Forrajes*, 1-12.
- Galindo, J., González, N., Delgado, D., Sosa, A., Marrero, Y., González, R., Moreira, O. (2008). Efecto modulador de *Leucaena leucocephala* sobre la microbiota ruminal. *Zootecnia Tropical*, 249-252.
- García, D. (2010). Aislamiento de Microorganismos Probióticos a Partir de Bebidas Fermentadas. Buenavista: Universidad Autónoma Agraria.
- García, M., López, Y., & Carcasses, A. (2012). Empleo de probióticos en los animales. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1-8.
- Goyzueta, G. (2005). Majestuoso Lago Titicaca Fuente de Vida. Puno: San Gabán.

- Goyzueta, G., Alfaro, R., & Aparicio, M. (2009). Totorales del lago Titicaca: Importancia, Conservación y Gestión Ambiental (Primera ed.). Puno: Universidad Nacional del Altiplano Puno.
- Gracia, C. (2012). Ecología Forestal: Estructura, Funcionamiento y Producción de las masas forestales. Madrid.
- Grassé, P. (1982). TERMITOLOGÍA: Anatomía, Fisiología y Reproducción de Termitas. MASSON: Fundación Singer-Polignac.
- Grillo, D., Paez, S., Egea, V., Cerón, M., Cobos, E., Allegretti, L., & Arenas, N. (2011). Determinación in vitro de la Digestibilidad de la Celulosa contenida en pasturas autóctonas por una Cepa de *Fibrobacter succinogenes* aislada de Cabras Biotipo Criollo. *Revista bioanálisis*, 35.
- Guerrero, A. C. (2011). Aislamiento de bacterias ruminales degradadoras de celulosa. Cuenca: Universidad Politécnica Salesiana.
- Hernández, D., & Cobos, P. (2001). Digestibilidad in vitro, población de bacterias celulolíticas y totales del apéndice cecal, ciego y colon del conejo. *Técnica Pecuaria en México*, 229-236.
- Hidalgo, J. F. (2007). Totoras Material de Construcción. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Ibañez, V. (2009). Métodos Estadísticos. Puno: Universidad Nacional del Altiplano.
- Ibarra, J. (2006). Aislamiento de Bacterias Anaerobias Hidrogenotróficas en el Tracto Gastrointestinal del Avestruz (*Struthio camelus*). Tecomán: Universidad de Colima.
- Izurieta, N. (24 de Abril de 2011). SlideShare. Recuperado el 16 de Junio de 2017, de Recuento Bacteriano: <https://es.slideshare.net/nataliaizurieta/laboratorio-no-4-recuento-bacteriano-7723447>
- Koneman, W., & Allen, S. (2008). Koneman. Diagnóstico Microbiológico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas (sexta ed.). New York: Ed. Médica Panamericana.

- Lagunas , S., & Vega, F. L. (2013). Manual de Prácticas de Laboratorio de Bacteriología y Micología. Toluca, Mexico: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.
- Lara, C. (2005). Producción de Biomasa Microbiana con Características Probióticas para Mejorar la Fermentación Ruminal en Ganado Vacuno. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander.
- Lara, C., & Acosta, R. (2013). Bacterias celulolíticas aisladas del intestino de termitas (*Nasutitermes nigriceps*) con características probióticas y potencial en la degradación del pasto. Revista Colombiana de Biotecnología.
- Llanos, M. Y. (2017). Bacterias solubilizadoras de fosfato del género bacillus en suelos de la provincia de el collao (puno) y su efecto en la germinación y crecimiento de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en condiciones de invernadero. Puno: Universidad Nacional del Altiplano.
- López, L., Hernández, M., Colín, C., & Ortega, S. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Revista de investigación en discapacidad, 10-18.
- Macarron, R. (1992). Purificación y caracterización de endoglucanasa III de *Trichodenna reesei* QM9414. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Mansfield, S., Mooney, C., & Saddler, J. (1999). Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. Biotechnol, 805 - 816.
- Marín, R. (2007). Caracterización y expresión recombinante de una celulasa de origen antártico. Santiago de Chile: Universidad de Chile.
- Martínez, C., Balcázar, E., Dantán, E., & Folch, J. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. Revista Latinoamericana de Microbiología, 119-131.
- Martinez, M., del Río, R., Salgado , R., Lopez, R., Flores, A., Morales, M., & Raya, D. (2009). Microbiota intestinal de la termita *Incisitermes marginipennis* Latreille (ISOPTERA:KALOTERMITIDAE). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 352-353.
- Ministerio de Agricultura. (2008). Plan Regional de Desarrollo Ganadero de Puno al 2015. Puno: Ministerio de Agricultura.

- Ortiz, A., & Reuto, J. I. (2007). Evaluación de la capacidad probiótica in vitro de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. Bogota: Pontificia Universidad Javeriana.
- Ortíz, M., Muñoz, L., Ballinas, L., Calvillo, C., & Rascón, Q. (2010). Caracterización de bacterias degradadoras de celulosa. Memorias del VII congreso del noreste y III nacional de ciencias alimentarias y biotecnología, 1-5.
- Pennisi, E. (2015). Africa's soil engineers: Termites. *Science*, 596-597.
- Perez, L. (2007). Aislamiento y Evaluación de Microorganismos Celulolíticos a Partir de Residuos Vegetales Frescos y en Compost Generados en un Cultivo de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Quintero, L., Hernández, D., Pimentel, G., Rodríguez, D. J., Campos, M. E., & Montiel, R. G. (2009). Caracterización del componente prebiótico de *Aspergillus niger* estimulante de bacterias celulolíticas de origen ruminal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 51-55.
- Ramin, M., Alimon, A., Abdullah, N., Panandam, J., & Sijam, K. (2008). Isolation and identification of three species of bacteria from the termite *Coptotermes curvignathus* (Holmgren) present in the vicinity of University Putra Malaysia. *Research Journal of Microbiology*, 288-292.
- Ramirez, J. C., & Lanfranco, D. (2001). Descripción de la biología, daño y control de las termitas: especies existentes en Chile. *BOSQUE*, 77-84.
- Romeu, B. (2012). Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de la Habana. La Habana: Universidad de la Habana.
- Rondón, A., Samaniego, L., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ranilla, M., Pérez, M. (2009). Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus sp.* procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. Obtenido de *Ciencia y Tecnología Alimentaria*.

- Sakar, A., Varma, A., & Sakar, A. (1988). Influence of cellulolytic organisms associated with a termite, *Odontotermes obesus*, on carbon mobility in a semiarid ecosystem. *Arid Land Research and Management*, 75-84.
- Sánchez, I. (2014). Diversidad Microbiana y Taxonomía. Recuperado el 17 de Junio de 2017, de Genero Micrococcus:
http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=773&Itemid=819
- Sánchez, J. M., Peralta, A., Trinidad, A., Alcalá, V., & Vargas, J. (2002). Aislamiento de bacterias ruminales degradadoras del aserrín. *Agrociencia*, 523-530.
- Sánchez, L., Omura, M., Lucas, A., Pérez, T., Llanes, M., & Luce, C. (2015). Cepas de *Lactobacillus spp.* con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. *Revista Salud Animal*, 94-104.
- Sandoval, F. (2011). Bacterias del río calle-calle (sector pishuenco), implicadas en la degradación de celulosa. Valdivia: Universidad Austral de Chile.
- Santambrosio, E., Ortega, M., & Garibaldi, P. A. (2009). Preparación de medios de cultivo. España: Universidad Tecnológica Nacional.
- Sosa, D., Larco, C., Falconí, R., Toledo, D., & Suárez, G. (2006). Digestibilidad de maralfalfa (*Pennisetum sp.*) en cabras. *Boletín Técnico 5, Serie Zoológica Sangolquí*, 72.
- Soto, C. (2001). El uso de aditivos en la alimentación de los rumiantes: Importancia de los bioensayos con microorganismos del rumen. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, 54-62.
- Syaukani, & Thompson, G. (2011). Taxonomic Notes on *Nasutitermes* and *Bulbitermes* (Termitidae, Nasutitermitinae) from the Sunda region of Southeast Asia based on morphological and molecular characters. *ZooKeys*, 137-160.
- Terragno, R., Caffer, M. I., & Binsztein, N. (2007). Manual de Procedimientos: Diagnóstico y caracterización de *Shigella spp.* América del Sur: Departamento Bacteriología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas.

- Theather, R., & Wood, P. (1982). Use of congo red-polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol*, 777-780.
- Ticona, I. (1980). Determinación del cariotipo de la totora en el lago Titicaca. Puno: Universidad Nacional del Altiplano.
- Urdaneta, F. (2009). Mejoramiento de la eficiencia productiva de los sistemas de ganadería bovina de doble propósito (Taurus-Indicus). *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 117-118.
- Van Lier, & Regueiro. (2008). Digestión en retículo-rumen. Montevideo: Curso de anatomía y fisiología animal.
- Vásquez, I. (2011). Densidad óptica (absorbancia) y turbidimetría para cuantificación de biomasa. Quito: Universidad Central del Ecuador.
- Viteri, F., Castillo, D. A., & Viteri, S. E. (2015). Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia. *Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos*, 362-367.
- World Gastroenterology Organisation. (2011). Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. *Guías Mundiales de la WGO*, 1-29.
- Zhang, Y., Himmel, M., & Mielenz, J. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 452-481.

ANEXOS

ANEXO A



Figura 31. Zona de toma de muestra (1) de termitas (*Nasutitermes longinasus*),
Massiapo – Sandia, Mayo 2017.

Fuente: Google Eart (2017).



Figura 32. Zona de toma de muestra (2) de totora (*Schoenoplectus tatora*), Chucuito–
Puno, Mayo 2017.

Fuente: Google Eart (2017).

ANEXO B

MÉTODO TUBIMETRICO PARA CUNTIFICACIÓN DE BACTERIAS

1. Principio

La turbidimetría mide la reducción de la transmisión de luz debido a partículas de una suspensión y cuantifica la luz residual transmitida.

2. Fundamento del método

Son muy usados en la práctica cotidiana del laboratorio. La base común de estos métodos consiste en la medición de la cantidad de luz dispersada o transmitida a través de un cultivo bacteriano. Recordemos aquí que las suspensiones bacterianas dispersan la luz, al igual que cualquier partícula pequeña suspendida en agua (efecto Tyndall). La dispersión de la luz es, dentro de ciertos límites, proporcional a la masa del cultivo. Para lo cual se debe de realizar una curva de calibración utilizando la escala de McFarlam que son patrones de turbidez ya establecidos iguales a una respectiva carga bacteriana en UFC/ml.

3. Preparación de la escala de McFarlam

Se prepara el cloruro de bario dihidratado al 1% p/v en un matraz con agua destilada estéril y también se prepara el Ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1% v/v de igual manera en un matraz con agua destilada estéril. Teniendo estas dos soluciones listas se procede a preparar la escala de McFarlam en tubos de 10 ml de capacidad con tapa rosca, en donde se les incorpora una cantidad de cada solución en concentraciones distintas, lo cual formara una turbidez equivalente a una cantidad estandarizada de UFC/ml, como se aprecia en la Tabla 9.

Tabla 9. Escala de McFarlam.

Número de la turbidez estándar	Cloruro de bario dihidratado (1% p/v)	Ácido Sulfúrico (1% v/v)	Volumen final de los tubos	Densidad de bacterias aproximada correspondiente
0.5	0.5 ml	99.5 ml	100 ml	1×10^8 UFC/ml
1	0.1 ml	9.9 ml	10 ml	3×10^8 UFC/ml
2	0.2 ml	9.8 ml	10 ml	6×10^8 UFC/ml
3	0.3 ml	9.7 ml	10 ml	9×10^8 UFC/ml
4	0.4 ml	9.6 ml	10 ml	12×10^8 UFC/ml
5	0.5 ml	9.5 ml	10 ml	15×10^8 UFC/ml
6	0.6 ml	9.4 ml	10 ml	18×10^8 UFC/ml
7	0.7 ml	9.3 ml	10 ml	21×10^8 UFC/ml
8	0.8 ml	9.2 ml	10 ml	24×10^8 UFC/ml
9	0.9 ml	9.1 ml	10 ml	27×10^8 UFC/ml
10	1.0 ml	9.0 ml	10 ml	30×10^8 UFC/ml

Fuente: (CDC & OMS, 2009).

4. Desarrollo de la curva patrón de turbidez

Se mide la densidad óptica de cada tubo (Figura 33) a 540 nm de longitud de onda, luego de ello los resultados son llevados al paquete estadístico INFOSTAT versión estudiantil y con ello obtener los valores la fórmula ($Y = aX + b$, Dónde: Y es igual a la absorbancia obtenida y X es igual a las UFC/ml en la muestra; y también obtener el valor del coeficiente de correlación r); con lo que de obtendrán los resultados finales en UFC/ml de las muestras a estudiar.



Figura 33. Escala de turbidez de McFarlam realizada en el laboratorio de bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA-Puno, Junio 2017.

TÉCNICA DEL ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO (DNS) PARA DETERMINAR AZÚCARES REDUCTORES

1. Fundamento del método

El fundamento consiste en la oxidación de la glucosa, sin embargo, la glucosa en solución acuosa se encuentra en su forma cíclica que es muy estable y por lo tanto, no reacciona. Por esta razón, es necesario calentar la muestra para que el anillo se abra dejando expuesto el aldehído dando lugar a una reacción de oxidación.

Para que se dé la reacción también es necesario proporcionar un medio alcalino, esto es posible gracias a la adición de NaOH el cual es una base fuerte. En solución acuosa se ioniza liberando Na^+ y OH^- al medio, el cual se alcaliniza, permitiendo la oxidación de la glucosa; en esta oxidación, el carbono del grupo aldehído se convierte en un ácido carboxílico por la pérdida de hidrógenos y la ganancia de oxígeno, obteniéndose de esta forma el ácido glucónico; por otro lado, el ácido 3,5 dinitrosalicílico es reducido gracias a la acción del tartrato de sodio y potasio y de la oxidación de la glucosa. El ácido pierde una de sus configuraciones 3 ó 5, principalmente la 3 por ser más reactiva, quedando ácido 3-amino-5-nitrosalicílico el cual produce una coloración amarilla que se va intensificando a naranja cada vez más fuerte con el aumento de glucosa en el medio por lo que la coloración es proporcional a la concentración de glucosa. Finalmente se frena la reacción reduciendo la temperatura, por lo general con hielo, haciendo que la molécula de glucosa se cierre y adquiera de nuevo su configuración piranosa (Fajardo & Sarmiento, 2007).

2. Preparación del Ácido 3,5-dinitrosalicílico

Se pesan 0.5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 15 g de tartrato de sodio y potasio (Na-K) y 0.8 g de hidróxido de sodio (NaOH). Se disuelve luego el NaOH en 20 ml de agua destilada y se añade en agitación el tartrato de Na-K lentamente. Se completa con agua hasta 40 ml y se comienza a añadir lentamente el ácido 3,5 dinitrosalicílico. Esto se deja en agitación hasta que se incorporen totalmente todos los reactivos en promedio 12 horas o toda la noche. Luego se enrasa a 50 ml con agua destilada y se filtra. Finalmente este se conserva en un frasco color caramelo etiquetado (Bello *et al.*, 2006). Estos datos pueden variar de acuerdo a la cantidad de reactivo que se quiera preparar con una regla de tres simple usando dichos valores.

3. Desarrollo de la reacción del DNS

En tubos de cristal de 10 ml se adicionan 0.5 ml de muestra y 0.5 ml de reactivo de DNS. Los tubos se colocan en baño de agua a 100°C (ebullición) por 5 minutos. Se enfrían hasta temperatura ambiente y se le añade 5 ml de agua destilada. Se agita fuertemente y se realiza con ello la lectura a 540 nm en espectrofotómetro.

4. Desarrollo de la curva de calibración de la glucosa

Se prepara la solución patrón de Glucosa en tubos de cristal en concentraciones de 0.2, 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.7 y 2.0 g de glucosa en 1L de agua cada una. Se desarrolla la reacción con el reactivo DNS y se lee en espectrofotómetro a 540 nm usando como blanco un preparado igual solo con agua destilada.

Los resultados luego son llevados al paquete estadístico INFOSTAT versión estudiantil. Para obtener la fórmula de calibración ($Y = aX + b$, Dónde: Y es igual a la absorbancia obtenida y X es igual a la cantidad de glucosa en la muestra; y también obtener el valor del coeficiente de correlación r); con lo que se obtendrán los resultados finales de azúcares reductores.

ANEXO C

Tabla 10. Resultados cuantitativos de la prueba de tolerancia a temperatura; Puno, Abril a Junio del 2017.

Bacteria	Tratamiento	UFC/ml a las 0 horas	D.O. 24 horas	UFC/ml a las 24 horas	% de sobrevivencia
BC3	Temp. 20°C	1.5x10 ⁸	0.103	4.06x10 ⁴	56.36%
		1.5x10 ⁸	0.105	4.08x10 ⁴	56.39%
		1.5x10 ⁸	0.104	4.07x10 ⁴	56.37%
	Temp. 37°C	1.5x10 ⁸	0.776	8.53x10 ⁸	109.23%
		1.5x10 ⁸	0.776	8.53x10 ⁸	109.23%
		1.5x10 ⁸	0.776	8.53x10 ⁸	109.23%
	Temp. 45°C	1.5x10 ⁸	0.564	4.56x10 ⁸	105.90%
		1.5x10 ⁸	0.572	4.71x10 ⁸	106.07%
		1.5x10 ⁸	0.568	4.64x10 ⁸	105.99%
BDC4	Temp. 20°C	1.5x10 ⁸	0.780	8.61x10 ⁸	109.28%
		1.5x10 ⁸	0.794	8.87x10 ⁸	109.44%
		1.5x10 ⁸	0.787	8.74x10 ⁸	109.36%
	Temp. 37°C	1.5x10 ⁸	0.730	7.67x10 ⁸	108.66%
		1.5x10 ⁸	0.712	7.34x10 ⁸	108.43%
		1.5x10 ⁸	0.721	7.52x10 ⁸	108.56%
	Temp. 45°C	1.5x10 ⁸	0.073	4.62x10 ⁴	57.05%
		1.5x10 ⁸	0.081	4.89x10 ⁴	57.35%
		1.5x10 ⁸	0.077	4.75x10 ⁴	57.19%
BDC10	Temp. 20°C	1.5x10 ⁸	0.732	7.71x10 ⁸	108.69%
		1.5x10 ⁸	0.780	8.61x10 ⁸	109.28%
		1.5x10 ⁸	0.756	8.16x10 ⁸	108.99%
	Temp. 37°C	1.5x10 ⁸	0.830	9.55x10 ⁸	109.83%
		1.5x10 ⁸	0.796	8.91x10 ⁸	109.22%
		1.5x10 ⁸	0.813	9.23x10 ⁸	109.65%
	Temp. 45°C	1.5x10 ⁸	0.251	1.29x10 ⁷	86.96%
		1.5x10 ⁸	0.269	1.38x10 ⁷	87.32%
		1.5x10 ⁸	0.260	1.32x10 ⁷	87.09%
BDC11	Temp. 20°C	1.5x10 ⁸	0.786	8.72x10 ⁸	109.34%
		1.5x10 ⁸	0.784	8.68x10 ⁸	109.32%
		1.5x10 ⁸	0.785	8.70x10 ⁸	109.33%
	Temp. 37°C	1.5x10 ⁸	0.805	9.08x10 ⁸	109.56%
		1.5x10 ⁸	0.800	8.98x10 ⁸	109.50%
		1.5x10 ⁸	0.803	9.04x10 ⁸	109.54%
	Temp. 45°C	1.5x10 ⁸	0.153	3.12x10 ⁵	67.19%
		1.5x10 ⁸	0.181	3.87x10 ⁵	68.34%
		1.5x10 ⁸	0.167	3.67x10 ⁵	68.06%

Tabla 11. Resultados cuantitativos de la prueba de tolerancia a sales biliares; Puno, Abril a Junio del 2017.

Bacteria	Tratamiento	UFC/ml a las 0	UFC/ml a las	% de sobrevivencia
		horas	24 horas	
BC3	SB 0.0%	1.5x10 ⁸	8.00x10 ⁸	108.89%
		1.5x10 ⁸	3.00x10 ⁸	103.68%
		1.5x10 ⁸	5.50x10 ⁸	106.90%
	SB 0.3%	1.5x10 ⁸	0	0.00%
		1.5x10 ⁸	0.1X10 ⁵	48.92%
		1.5x10 ⁸	0	0.00%
	SB 0.6%	1.5x10 ⁸	0	0.00%
		1.5x10 ⁸	0	0.00%
		1.5x10 ⁸	0	0.00%
BDC4	SB 0.0%	1.5x10 ⁸	3.65x10 ¹⁰	129.18%
		1.5x10 ⁸	3.25x10 ¹⁰	128.56%
		1.5x10 ⁸	3.45x10 ¹⁰	128.89%
	SB 0.3%	1.5x10 ⁸	2.9x10 ¹⁰	125.71%
		1.5x10 ⁸	2.35x10 ¹⁰	126.81%
		1.5x10 ⁸	2.62x10 ¹⁰	126.32%
	SB 0.6%	1.5x10 ⁸	3.2x10 ⁹	116.84%
		1.5x10 ⁸	5x10 ⁹	118.62%
		1.5x10 ⁸	4.1x10 ⁹	117.57%
BDC10	SB 0.0%	1.5x10 ⁸	3.8x10 ¹⁰	129.39%
		1.5x10 ⁸	3.75x10 ¹⁰	129.32%
		1.5x10 ⁸	3.78x10 ¹⁰	129.37%
	SB 0.3%	1.5x10 ⁸	4.95x10 ¹⁰	130.80%
		1.5x10 ⁸	7.35x10 ¹⁰	132.90%
		1.5x10 ⁸	6.15x10 ¹⁰	131.95%
	SB 0.6%	1.5x10 ⁸	7.4x10 ⁹	120.70%
		1.5x10 ⁸	9.5x10 ⁹	122.03%
		1.5x10 ⁸	8.45x10 ⁹	121.41%
BDC11	SB 0.0%	1.5x10 ⁸	2.34x10 ¹²	151.28%
		1.5x10 ⁸	2.13x10 ¹²	150.78%
		1.5x10 ⁸	2.23x10 ¹²	151.02%
	SB 0.3%	1.5x10 ⁸	3.5x10 ¹⁰	128.96%
		1.5x10 ⁸	7x10 ¹⁰	132.64%
		1.5x10 ⁸	5.25x10 ¹⁰	131.12%
	SB 0.6%	1.5x10 ⁸	1.4x10 ¹⁰	124.09%
		1.5x10 ⁸	1.3x10 ¹⁰	123.70%
		1.5x10 ⁸	1.35x10 ¹⁰	123.90%

Tabla 12. Resultados cuantitativos de la prueba de resistencia al cloruro de sodio; Puno, Abril a Junio del 2017.

Bacteria	Tratamiento	UFC/ml a las 0 horas	D.O. 24 horas	UFC/ml a las 24 horas	% de sobrevivencia
BC3	NaCl-0%	1.5x10 ⁸	0.780	8.61x10 ⁸	109.28%
		1.5x10 ⁸	0.810	9.17x10 ⁸	109.61%
		1.5x10 ⁸	0.795	8.89x10 ⁸	109.45%
	NaCl-4%	1.5x10 ⁸	0.754	8.12x10 ⁸	108.97%
		1.5x10 ⁸	0.776	8.53x10 ⁸	109.23%
		1.5x10 ⁸	0.765	8.33x10 ⁸	109.10%
	NaCl-8%	1.5x10 ⁸	0.098	4.15x10 ⁴	56.48%
		1.5x10 ⁸	0.104	4.19x10 ⁴	56.53%
		1.5x10 ⁸	0.101	4.16x10 ⁴	56.49%
BDC4	NaCl-0%	1.5x10 ⁸	0.728	7.64x10 ⁸	108.64%
		1.5x10 ⁸	0.718	7.45x10 ⁸	108.51%
		1.5x10 ⁸	0.723	7.54x10 ⁸	108.57%
	NaCl-4%	1.5x10 ⁸	0.484	3.07x10 ⁸	103.80%
		1.5x10 ⁸	0.482	3.03x10 ⁸	103.73%
		1.5x10 ⁸	0.483	3.05x10 ⁸	103.76%
	NaCl-8%	1.5x10 ⁸	0.063	4.16x10 ⁴	56.49%
		1.5x10 ⁸	0.091	4.28x10 ⁴	56.64%
		1.5x10 ⁸	0.077	4.55x10 ⁴	56.97%
BDC10	NaCl-0%	1.5x10 ⁸	0.815	9.26x10 ⁸	109.66%
		1.5x10 ⁸	0.788	8.76x10 ⁸	109.37%
		1.5x10 ⁸	0.802	9.02x10 ⁸	109.52%
	NaCl-4%	1.5x10 ⁸	0.812	9.21x10 ⁸	109.63%
		1.5x10 ⁸	0.820	9.36x10 ⁸	109.72%
		1.5x10 ⁸	0.816	9.28x10 ⁸	109.68%
	NaCl-8%	1.5x10 ⁸	0.148	3.22x10 ⁵	67.36%
		1.5x10 ⁸	0.154	3.34x10 ⁵	67.55%
		1.5x10 ⁸	0.151	3.33x10 ⁵	67.54%
BDC11	NaCl-0%	1.5x10 ⁸	0.800	8.98x10 ⁸	109.50%
		1.5x10 ⁸	0.796	8.91x10 ⁸	109.46%
		1.5x10 ⁸	0.798	8.95x10 ⁸	109.48%
	NaCl-4%	1.5x10 ⁸	0.580	4.86x10 ⁸	106.24%
		1.5x10 ⁸	0.622	5.65x10 ⁸	107.04%
		1.5x10 ⁸	0.601	5.26x10 ⁸	106.66%
	NaCl-8%	1.5x10 ⁸	0.134	3.48x10 ⁵	67.77%
		1.5x10 ⁸	0.103	4.06x10 ⁴	56.36%
		1.5x10 ⁸	0.119	3.76x10 ⁵	68.18%

Tabla 13. Resultados cuantitativos de la prueba de tolerancia a pH; Puno, Abril a Junio del 2017.

Bacteria	Tratamiento	UFC/ml a las 0	UFC/ml a las	% de sobrevivencia
		horas	24 horas	
BC3	pH-5	1.5×10^8	1.85×10^7	88.88%
		1.5×10^8	1.95×10^7	89.10%
		1.5×10^8	1.9×10^7	89.02%
	pH-6	1.5×10^8	2.5×10^9	114.73%
		1.5×10^8	3.5×10^9	116.73%
		1.5×10^8	3×10^9	115.91%
	pH-7	1.5×10^8	1×10^9	110.07%
		1.5×10^8	1×10^9	110.07%
		1.5×10^8	1.2×10^9	111.05%
BDC4	pH-5	1.5×10^8	4.15×10^{10}	129.86%
		1.5×10^8	6×10^{10}	131.91%
		1.5×10^8	5.08×10^{10}	130.94%
	pH-6	1.5×10^8	6.35×10^{10}	132.12%
		1.5×10^8	6.35×10^{10}	132.12%
		1.5×10^8	6.26×10^{10}	132.05%
	pH-7	1.5×10^8	2.55×10^{10}	127.28%
		1.5×10^8	4.35×10^{10}	130.11%
		1.5×10^8	3.45×10^{10}	128.89%
BDC10	pH-5	1.5×10^8	3.35×10^{10}	128.96%
		1.5×10^8	1.45×10^{10}	124.28%
		1.5×10^8	2.40×10^{10}	126.96%
	pH-6	1.5×10^8	6.30×10^{11}	144.31%
		1.5×10^8	5.00×10^{11}	140.37%
		1.5×10^8	5.65×10^{11}	143.73%
	pH-7	1.5×10^8	5.80×10^{11}	143.87%
		1.5×10^8	2.65×10^{11}	139.71%
		1.5×10^8	2.22×10^{11}	142.20%
BDC11	pH-5	1.5×10^8	7.1×10^{10}	132.71%
		1.5×10^8	6.1×10^{10}	131.91%
		1.5×10^8	6.6×10^{10}	132.33%
	pH-6	1.5×10^8	1.86×10^{11}	137.83%
		1.5×10^8	1.4×10^{11}	136.32%
		1.5×10^8	1.63×10^{11}	137.13%
	pH-7	1.5×10^8	5.2×10^{10}	131.06%
		1.5×10^8	8.45×10^{10}	133.64%
		1.5×10^8	6.83×10^{10}	132.51%

Tabla 14. Resultados de la prueba de azúcares reductores con el reactivo DNS; Puno, Abril a Junio del 2017.

Bacteria	Tratamiento	D.O 24 horas	Producción de gas	Azúcares Reductores (g/l)
BC3	24 Horas	0.329	Positivo	0.001824
		0.341	Positivo	0.014770
		0.335	Positivo	0.008297
	48 Horas	0.439	Positivo	0.119875
		0.47	Positivo	0.088752
		0.455	Positivo	0.104314
	72 Horas	0.845	Negativo	0.555591
		0.730	Negativo	0.432174
		0.788	Negativo	0.493883
BDC4	24 Horas	0.388	Positivo	0.065142
		0.392	Positivo	0.069435
		0.390	Positivo	0.067289
	48 Horas	0.410	Positivo	0.088752
		0.418	Positivo	0.097338
		0.414	Positivo	0.093045
	72 Horas	0.744	Negativo	0.447198
		0.636	Negativo	0.331294
		0.690	Negativo	0.389246
BDC10	24 Horas	0.402	Positivo	0.080167
		0.389	Positivo	0.066215
		0.396	Positivo	0.073191
	48 Horas	0.444	Positivo	0.125241
		0.454	Positivo	0.135973
		0.449	Positivo	0.130607
	72 Horas	0.738	Negativo	0.440759
		0.644	Negativo	0.339879
		0.691	Negativo	0.390319
BDC11	24 Horas	0.381	Positivo	0.057630
		0.372	Positivo	0.047971
		0.377	Positivo	0.052801
	48 Horas	0.454	Positivo	0.135973
		0.472	Positivo	0.155290
		0.463	Positivo	0.145632
	72 Horas	0.450	Negativo	0.131680
		0.538	Negativo	0.226121
		0.494	Negativo	0.178901

Tabla 15. Resultados de la prueba de digestibilidad de la totora; Puno, Abril a Junio del 2017.

Bacteria	Tratamiento	PMS (g)	R (g)	% de Digestibilidad
BC3	24 Horas	1	0.92	8.00%
		1	0.87	13.00%
		1	0.90	10.50%
	48 Horas	1	0.80	20.00%
		1	0.74	26.00%
		1	0.77	23.00%
	72 Horas	1	0.78	22.00%
		1	0.74	26.00%
		1	0.76	24.00%
		1	0.88	12.00%
BDC4	24 Horas	1	0.89	11.00%
		1	0.89	11.50%
		1	0.81	19.00%
	48 Horas	1	0.79	21.00%
		1	0.80	20.00%
		1	0.79	21.00%
	72 Horas	1	0.76	24.00%
		1	0.78	22.50%
		1	0.89	11.00%
		1	0.85	15.00%
BDC10	24 Horas	1	0.87	13.00%
		1	0.89	11.00%
		1	0.84	16.00%
	48 Horas	1	0.87	13.50%
		1	0.80	20.00%
		1	0.82	18.00%
	72 Horas	1	0.81	19.00%
		1	0.83	17.00%
		1	0.86	14.00%
		1	0.85	15.50%
BDC11	48 Horas	1	0.75	25.00%
		1	0.83	17.00%
		1	0.79	21.00%
	72 Horas	1	0.73	27.00%
		1	0.80	20.00%
		1	0.77	23.50%

Dónde: PMS= Peso seco inicial de la totora en gramos.

R= Peso final de la totora en gramos luego de los tratamientos.

ANEXO D

Constancia de uso de laboratorio.



PERÚ
Ministerio
de Salud

HOSPITAL REGIONAL MANUEL NUÑEZ BUTRON - PUNO
AV. EL SOL N°1022



CENTRO DE REFERENCIA DE INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL
VIH/SIDA

“Año del Buen Servicio al Ciudadano”

CONSTANCIA

El Jefe de Laboratorio del Centro de Referencia de Infecciones de Transmisión Sexual VIH/SIDA del Hospital Regional “Manuel Nuñez Butrón” de Puno.

HACE CONSTAR:

Que el Sr. Diego Siwar LOAIZA CENTENO egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA Puno ha realizado la ejecución de su TESIS titulada “Aislamiento de bacterias celulolíticas con características probióticas del intestino de termitas y su evaluación como potenciales degradadoras de totora (*Schoenoplectus tatora*)” por el tiempo de 4 meses, en el laboratorio del Centro de Referencia de Infecciones de Transmisión Sexual VIH/SIDA del Hospital Regional “MNB” de Puno, ya que es un laboratorio equipado con todos los materiales y equipos necesarios por el tesista para la normal ejecución de su proyecto. Desde el 01 de Febrero al 26 de Mayo del 2017. Mostrando Puntualidad, Responsabilidad y deseos de superación.

Se expide el presente a solicitud personal para fines administrativos que crea por conveniente.

Puno, 30 de Mayo del 2017

Atentamente




M.Sc. Balmir F. Valdez Gallegos
CBP: 2882