

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE AGRONOMÍA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



TESIS

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS
DEL COMPARTIMENTO C1 DE LA ALPACA, CRIADAS BAJO UN ECOSISTEMA
DE PUNA HÚMEDA MEDIANTE MÉTODOS CONVENCIONALES**

PRESENTADA POR:

Br. REBECA LUISA APARICIO ARMAS

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL
DE MÉDICO VETERINARIO**

ASESORES:

PhD. Pedro Walter Bravo Matheus

M. Sc. Diana Sánchez Herencia

Financiado por: FONDECYT-PROCIENCIA

**CUSCO – PERÚ
2023**

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, Asesor del trabajo de investigación/tesis titulada: ASAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ANAEROBIAS DEL COMPARTIMENTO C1 DE LA ALPACA, CRIADAS BASO UN ECOSISTEMA DE RUNA HÚMEDA MEDIANTE MÉTODOS CONVENCIONALES presentado por: REBECA LUISA APARICIO ARNAS con DNI Nro.: 70897865 presentado por: con DNI Nro.: para optar el título profesional/grado académico de MÉDICO VETERINARIO

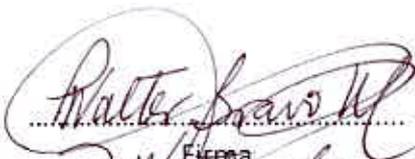
Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 3 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del *Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC* y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 10%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 1 de Agosto de 2023


Post firma P. Walter Bravo
Nro. de DNI 23954705
ORCID del Asesor 0000-0003-4141-3066


Diana Sánchez Herencia
40859920
Orcid: 0000-0003-6203-5354

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: TURNITIN orid:27259-247989055

NOMBRE DEL TRABAJO

Tesis Rebeca.pdf

AUTOR

Rebeca Luisa Aparicio Armas

RECUENTO DE PALABRAS

17561 Words

RECUENTO DE CARACTERES

103339 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

84 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

708.2KB

FECHA DE ENTREGA

Jul 22, 2023 5:10 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Jul 22, 2023 5:12 PM GMT-5**● 10% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 10% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Base de datos de trabajos entregados
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)
- Material bibliográfico
- Material citado
- Fuentes excluidas manualmente

Walter Bravo

Diana Sánchez Merencia
40854420

DEDICATORIA

A Dios, por enseñarme a ser más humano cada día.

Con mucho cariño para mi querida madre, Livia Armas Vda. de Aparicio y para mi querido padre Luis Aparicio Choquenaira quien en vida fue, por su sacrificio y amor desinteresado quienes me guiaron y formaron para ser la persona quien soy hoy en día.

A mis queridos hermanos, Rina, Rodil, Julio, Rosa, Aleli, Regina y mi querido sobrino Junior, por compartir alegrías y tristezas, por su amistad, confianza, y por permitirme formar parte de su vida. Gracias por ser ejemplo de vida, por estar conmigo en las buenas y las malas, los quiero muchísimo.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por bendecirme todos los días.

A mi alma mater, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Agronomía y Zootecnia, y en especial a la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria por la formación impartida y ser mi segundo hogar.

A Centro Experimental La Raya de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNA-PUNO, por haberme acogido en sus instalaciones y permitido realizar el trabajo de tesis.

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT), PROCENCIA, por el apoyo financiero para hacer posible la investigación (Contrato N.º 377-2019-FONDECYT).

Al Dr. Pedro Ubaldo Coila Añasco, por confiar en mi persona para realizar este trabajo.

A mis asesores: PhD. Pedro Walter Bravo Matheus, Dr. Pedro Ubaldo Coila Añasco, M.Sc. Oscar David Oros Butrón y M. Sc. Diana Sánchez Herencia, por fomentarme el interés por el estudio, quienes con mucha paciencia, nobleza, disponibilidad y experiencia me aportaron todos los conocimientos profesionales y personales durante la ejecución, redacción y culmen de esta tesis.

A todos los docentes de la Escuela profesional de Medicina Veterinaria- Espinar, por impartir y aportar sus conocimientos durante mi formación profesional, para llegar a finalizar con éxito mi carrera profesional.

A los doctores MVZ. Leoncio Mamani, MVZ. Walter Pablo Benavente, MVZ. Ceferino Uberto Olarte y MVZ. Ángel Quispe por su amistad y apoyo.

A mi madre y hermanos por su apoyo incondicional, por alentarme y darme fuerza durante mi formación profesional y durante el proceso de ejecución del presente.

A mis amigas, Winny Katherine, Ruth, Jenny Nohemí y compañeros, por compartir su amistad, conocimientos y consejos, gracias por ser parte de esta noble profesión.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
I. PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN	3
1.1 Identificación del Problema Objeto de Investigación.....	3
1.2 Planteamiento del Problema	4
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	6
2.1 Justificación	6
2.2 Objetivos.....	8
2.2.1 Objetivo General.....	8
2.2.2 Objetivos Específicos.....	8
III. HIPÓTESIS.....	9
3.1 Hipótesis General.....	9
3.2 Hipótesis Especifico.....	9
IV. MARCO TEÓRICO.....	10
4.1 Bases Teóricas	10
4.2 Antecedentes	27

V.	DISEÑO Y METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	33
5.1	Tipo y Diseño de la Investigación	33
5.2	Ubicación Espacial y Temporal de la Investigación.....	33
5.3	Materiales y Equipos.....	34
5.4	Población y Muestra	36
5.4.1	Toma de Muestra	37
5.4.2	Aislamiento de Bacterias Anaerobias	38
5.4.3	Resiembra o Repique	40
5.4.4	Identificación De Bacterias Anaerobias Estrictas.....	41
5.4.4.1	Caracterización Fenotípica.....	42
5.4.4.2	Caracterización Bioquímica.....	43
VI.	RESULTADOS.....	45
6.1	Resultados del Aislamiento de Bacterias Anaerobias del Compartimento C1 ..	46
6.2	Resultados de la Caracterización Fenotípica de Bacterias Anaerobias Aisladas del Compartimento C1	47
6.2.1	Resultados de la Caracterización Macroscópica y Microscópica.....	47
6.2.2	Resultados de la Caracterización Bioquímicas para la Identificación de las Bacterias Anaerobias Aisladas.....	49
6.3	Resultados de la Identificación de las Bacterias Anaerobias Aisladas	51

VII.	DISCUSIÓN	54
VIII.	CONCLUSIONES	58
IX.	RECOMENDACIONES.....	59
X.	REFERENCIAS.....	60
XI.	ANEXOS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación Satelital del CIP La Raya Puno.....	34
Figura 2. Materiales de Laboratorio	35
Figura 3. Recuperación del Tracto Digestivo de un Alpaca Recientemente Beneficiada	37
Figura 4. Recolección de Licor a través del Tamizaje del Contenido C1	38
Figura 5. Cultivo Primario de Bacterias Anaerobias a partir del Licor y Pared del Compartimento C1.....	38
Figura 6. Placas Apiladas en Forma Invertida Antes de Someter a Incubación.....	39
Figura 7. Jarra de Anaerobiosis, Sistema de Incubación en Anaerobiosis con el Sobre de BBL GasPak (Indicadores de Anaerobiosis)	40
Figura 8. Selección de Placas de Cultivo Primario con Crecimiento de Colonias Separadas para Repique en tubo	40
Figura 9. Procedimiento de Resiembra a partir de Colonias Aisladas de Cultivo Primario...	41
Figura 10. Reactivos Empleados para la tinción de Gram.....	42
Figura 11. Proceso de Lavado del Exceso del Colorante Cristal Violeta.....	43
Figura 12. Resultados de Resiembra de Bacterias Anaerobias del C1, en la Profundidad del Tubo con Medio de Cultivo Agar Brewer Anaerobic.....	45
Figura 13. Prueba de Aerotolerancia en Placa.....	47
Figura 14. Resultados de la Prueba Catalasa	50
Figura 15. Resultados de la Prueba KIA.....	51
Figura 16. Resultados de la Prueba de Citrato de Simonns	51
Figura 17. Ruminococcus sp.....	52
Figura 18. Fibrobacter sp.....	53
Figura 19. Butyrivibrio sp.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características de Algunas Bacterias Ruminales	20
Tabla 2 Resultados de Resiembra o Cultivo en Tubo.....	45
Tabla 3 Resultados de la Prueba de Aerotolerancia en Placa de Bacterias Anaerobias Aisladas del C1, en Medio de Cultivo de Agar Sangre Suplementado con L-Cysteina.....	46
Tabla 4 Caracterización Macroscópica y Microscópica de las Bacterias Anaerobias Aisladas del Compartimento C1 de la Alpaca.....	48
Tabla 5 Resultado de la Caracterización Microscópica de las Bacterias Aisladas como Anaerobios Estrictos a partir del Compartimento C1 de la alpaca, Mediente la Tinción de Gram	49
Tabla 6 Resultados de las Pruebas Bioquímicas para la Identificación de las Bacterias Anaerobias Aisladas del Compartimento C1 de la Alpaca.....	50
Tabla 7 Resultados de la Identificación de las Bacterias Anaerobias Aisladas del Compartimento C1 del Tracto Digestivo de la Alpaca.....	52

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1.....	66
ANEXO 2.....	66
ANEXO 3.....	67
ANEXO 4.....	68
ANEXO 5.....	69
ANEXO 6.....	71
ANEXO 7.....	73

GLOSARIO

CSA	: Camélidos sudamericanos
C1	: Compartimento 1 del sistema digestivo de la alpaca
C2	: Compartimento 2 del sistema digestivo de la alpaca
C3	: Compartimento 3 del sistema digestivo de la alpaca
H2S	: Sulfuro de hidrogeno
CIP	: Centro de investigación y producción
LC1	: Muestras obtenidas a partir de licor del compartimento C1
PC1	: Muestras obtenidas a partir de la pared del compartimento C1
AS-Cys	: Agar sangre suplementado con L-cisteína
BA	: Agar brewer anaerobic
BA-Cys	: Agar brewer anaerobic suplementado con L-cisteína
KIA	: Kliger iron agar
CS	: Citrato de Simons
SIM	: Sulfuro indol movilidad
4LC1BA	: Rotulado de muestras (número de muestra, procedencia y medio de cultivo en el que fue cultivado)

RESUMEN

La alpaca es un mamífero doméstico que tiene como alimentación básica pastos y forrajes de baja calidad. Las bacterias anaerobias que aloja en su tracto digestivo hacen posible la utilización de estos pastos en productos de alto valor biológico como la carne y fibra. En este contexto, es importante conocer y caracterizar las bacterias anaerobias presentes en el compartimento C1 de esta especie, como fuente primaria para otras investigaciones. El estudio tuvo como objetivo aislar y caracterizar las bacterias anaerobias del compartimento C1 usando pruebas convencionales. El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Centro Experimental La Raya de la Universidad Nacional de Altiplano Puno, para lo cual se utilizaron 34 muestras del licor y pared del compartimento C1, procedente de cuatro alpacas machos, raza Huacaya. El aislamiento y purificación de las cepas anaeróbicas se realizó mediante cultivos en medios adecuados utilizando jarras y sistemas de anaerobiosis. La caracterización e identificación de las cepas anaeróbicas aisladas se realizaron mediante pruebas convencionales de aerotolerancia, fenotípicas (morfológicas) y bioquímicas (catalasa, oxidasa, prueba Kligler, prueba citrato de Simmons y prueba de medio SIM). Se logró aislar e identificar cinco cepas anaeróbicas en total, correspondiendo dos cepas a *Ruminococcus sp*, dos cepas de *Fibrobacter sp* y otra de *Butyrivibrio sp*. Las tres cepas, tienen un rol fundamental en la degradación de carbohidratos complejos como la celulosa y otros polisacáridos fibrosos de difícil digestión.

Palabras clave: Alpaca; compartimento C1; identificación; bacterias anaerobias.

INTRODUCCIÓN

Las alpacas son mamíferos herbívoros considerados pseudorumiante, que se han adaptado a casi todo el mundo, habitando principalmente en países como Perú, Bolivia, Chile y Ecuador. La población de alpacas en el Perú alcanza los 3, 685, 516 millones, siendo Puno, Cusco y Arequipa, las regiones con mayor población de alpacas, Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI; 2013).

Los camélidos sudamericanos (CSA) a lo largo de los años han alcanzado un equilibrio con el medio ambiente, gracias a que usan diversos mecanismos biológicos, morfológicos, fisiológicos y de comportamiento, que les han permitido adaptarse a una atmósfera con condiciones desfavorables, a la altura, el frío y el consumo de forrajes de baja calidad nutritiva. Siendo así, uno de los mecanismos mejor adoptados por los CSA, la mayor eficiencia digestiva en relación con otras especies, quienes de manera óptima aprovechan los alimentos de baja calidad nutritiva para transformarlos en carne, fibra (San Martín, 1994).

Por esta razón, las alpacas constituyen un recurso genético de gran importancia social, económica, cultural y científica; además, cabe resaltar su importancia para el sector pecuario de las zonas altoandinas, quienes aprovechan su carne, fibra y piel como producto, donde no es posible la agricultura, ni el desarrollo de la crianza de otras especies (Avilés et al., 2018).

Por otro lado, los CSA han desarrollado un sistema digestivo especial, conformado por un estómago de tres compartimentos, poblada por un ecosistema microbiano complejo similar a otros rumiantes, que incluye bacterias, protozoos, arqueas y hongos. Las bacterias, en mayor proporción, son anaerobios estrictos, y en menor proporción anaerobios facultativos. Estas bacterias son responsables de la fermentación del forraje consumido por el animal convirtiéndolos en ácidos grasos volátiles, anhídrido carbónico, metano y amoníaco, un proceso fundamental para la nutrición del animal (Roque, 2012 y Cerón, 2015). Sin duda alguna, esta eficiencia radicaría en la composición de su población microbiana.

En un estudio reciente, se demostró que los líquidos de las cámaras fermentativas ruminales de alpacas, vacunos y ovinos mostraron ser excelentes fuentes de bacterias celulíticas y con alta capacidad degradadora de celulosa. Así mismo las cepas de alpacas demostraron ser eficientes para aplicaciones biotecnológicas como biofermentadores, biodegradadores y catalizadores biológicos en CSA y otras especies. La excelente capacidad degradativa de celulosa demostrada por las bacterias celulíticas provenientes de alpacas, posiblemente se deba a la presencia de mayor número de genes β -1,4-gluconasas y a su habitud en un estilo de pastoreo completo con diversidad de pastos naturales de las regiones altoandinas como alimento exclusivo, por lo que el compartimento C1 de la alpaca puede albergar una flora microbiana distinta de las de otras rumiantes debido a su dieta de componentes de fibra, ya que la dieta puede ser un factor importante (Carhuapoma et al., 2022).

En otras palabras, la población bacteriana que habita el contenido del compartimento C1 de las alpacas estaría compuesta por bacterias anaeróbicas Gram positivas y Gram negativas, en forma de bacilos, cocos, formando pares o cadenas. Sin embargo, las condiciones de anaerobiosis, es una de las mayores limitantes de este ecosistema, dificultando realizar el trabajo de aislamiento, caracterización e identificación de los microorganismos residentes (Cerón, 2014).

En este contexto, el presente proyecto de investigación tuvo por objeto realizar el aislamiento y caracterización de las bacterias anaerobias del compartimento C1 del tracto digestivo de la alpaca mediante métodos convencionales.

I. PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN

1.1 Identificación del Problema Objeto de Investigación

Los CSA, al igual que los rumiantes cuentan con un sistema digestivo muy espacioso y compartimentalizado. Sin embargo, diversos autores señalan que anatómica y estructuralmente, el sistema digestivo de los CSA difiere de otros rumiantes, porque presentan un estomago conformado por 3 compartimentos (C1, C2, C3), siendo C1, el más voluminoso de todos. Este compartimento posee dos porciones: craneal y caudal, ambas separadas por un surco transversal, similar al compartimento ruminal de los rumiantes. A su vez está conectado al segundo y más pequeño compartimento C2. Asimismo, poseen un surco ventricular de un simple labio muscular, el cual tiene la misma función que el surco reticular de ovinos y vacunos, el mismo que termina en el tercer compartimento C3, el cual es un compartimento tubular ligeramente dilatado en su porción final denominado estómago (San Martín, 1994; Raggi & Ferrando, 1998).

El contenido del compartimento C1 de la alpaca, posee un ecosistema microbiano complejo e incluye bacterias, protozoos, arqueas y hongos, las mismas que son en su gran mayoría anaerobios estrictos, y en menor proporción anaerobios facultativos. Esta población microbiana determina el patrón fermentativo, según los alimentos consumidos (San Martín & Olazabal, 2005; Cerón, 2015).

Por tal razón, es de suma importancia poder aislar e identificar la diversidad de bacterias presentes en el compartimento C1 del estómago de la alpaca ya que, sin duda alguna, los microorganismos presentes en el estómago contribuyen en la mayor eficiencia digestiva de forrajes fibrosos consumidos por parte de los camélidos. Sin embargo, las condiciones de anaerobiosis del compartimento C1 de la alpaca, es una de las mayores limitantes de este ecosistema para realizar su aislamiento, caracterización e identificación (Cerón, 2014).

No obstante, existen varios estudios donde se trabajó con métodos independientes de cultivo con la finalidad de revelar la diversidad bacteriana, mediante aislamiento bacteriano principalmente a partir del contenido ruminal de rumiantes y están dirigidos a microorganismos degradadores de fibra, productores de gas metano, pero son pocos los estudios reportados sobre el aislamiento e identificación de la población de bacterias a partir del compartimento C1 de los CSA. Cerón (2014) identificó *Butyrivibrio sp*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefociens*, en los compartimentos del tracto digestivo de las llamas, resultados similares fueron obtenidos por Ortiz (2012).

En este sentido, el presente proyecto de investigación tuvo como finalidad realizar el aislamiento y caracterización convencional de la población bacteriana anaerobia que habita el compartimento C1 del tracto digestivo de la alpaca.

1.2 Planteamiento del Problema

Perú posee el 87% de la población de alpacas del mundo y a nivel nacional el departamento de Puno posee la mayor población de alpacas con el 56%, la misma que se encuentra distribuido en la cordillera oriental o puna húmeda en mayor número y en la cordillera occidental o puna seca, bajo un sistema de pastoreo extensivo cuya alimentación básica constituye los pastos naturales de baja calidad y con algunas limitaciones como la baja soportabilidad por el efecto de sobrepastoreo (Mamani et al., 2021). La alpaca es uno de los CSA que pueden adaptarse a ambientes hostiles de pastoreo pobre, cálidos y fríos. La comunidad bacteriana del tracto gastrointestinal de los rumiantes juega un papel importante en el mantenimiento de la salud, asimismo, contribuyen en la mayor eficiencia digestiva de forrajes fibrosos consumidos por parte de los camélidos. En ese contexto ¿Qué especies de bacterias anaerobias, se puede aislar y caracterizar mediante métodos convencionales a partir del compartimento C1 del tracto digestivo de las alpacas, criadas bajo un ecosistema de Puna húmeda? Teniendo en consideración que el aislamiento de bacterias anaeróbicas es muy

complicado dada su naturaleza y que cualquier contacto con el aire, por ejemplo, conduce a su muerte, por lo que la intención del estudio, es obtener el máximo número de bacterias anaeróbicas que se pueden lograr.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 Justificación

El Perú es el principal productor de alpacas a nivel mundial, seguida de Bolivia, Chile y Ecuador; sin embargo, hoy en día las alpacas se han adaptado a casi todo el mundo. La alpaca constituye fuente principal de ingreso económico para el sector pecuario de las poblaciones altoandinas quienes dependen directamente de esta actividad, aprovechando, la carne, fibra, piel que ofrece estos animales como productos principales (INEI, 2013; Avilés et al., 2018).

Diversos estudios realizados en eficiencia digestiva, selectividad, consumo y nutrición de los CSA, son prueba que estas especies se encuentran mejor adaptadas a las condiciones ambientales adversas de las regiones andinas, gracias a su mayor eficiencia digestiva, alta tasa de conversión de alimentos de baja calidad (Cerón, 2014).

Las contracciones de los compartimentos del tracto digestivo de las alpacas son mayores a otros rumiantes, mientras la velocidad de tránsito de alimentos por el tracto digestivo es menor, estos dos hechos fisiológicos ayudan a una eficiente mezcla con un mayor tiempo de retención, lo que sumado a una fermentación de microorganismos celulíticos con excelente capacidad degradadora de la celulosa, en un ambiente favorable a hace a estas especies más eficientes en fermentar los pastos toscos y marginales que otros rumiantes (Raggi & Ferrando, 1998; Carhuapoma et al., 2022).

Los microorganismos residentes en los compartimentos del tracto digestivo de la alpaca determinan el patrón fermentativo del forraje consumido, un proceso fundamental para la nutrición del animal, ya que repercuten en la calidad de los productos obtenidos como fibra y carne. Asimismo, repercuten en el bienestar y salud de los animales, por otro lado, algunos productos finales de la fermentación como el metano, se considera como un potencial contaminante (Cerón, 2015). Sin duda alguna, esta eficiencia radicaría en la conformación de su población microbiana que habita el tracto digestivo de la alpaca.

A pesar de que, existen varios estudios con métodos independientes de cultivo con la finalidad de revelar la diversidad bacteriana, mediante el aislamiento bacteriano, están dirigidos al estudio de microorganismos degradadores de fibra, productores de gas metano a partir del contenido ruminal de los rumiantes, pero son pocos los estudios de aislamiento, caracterización e identificación de las bacterias anaerobias del contenido del compartimento C1 de la alpaca (Cerón, 2014).

Sin embargo; el contenido del compartimento C1 de la alpaca esta pobremente caracterizado debido a las condiciones de anaerobiosis ruminal, dificultando realizar su aislamiento e identificación (Cerón, 2015).

En la actualidad, existen avances en la metodología y técnicas de aislamiento bacteriano, como es la biología molecular, que se han empleado con éxito para monitorear microorganismos del rumen mediante PCRq en tiempo real y análisis de secuencias del gen 16s ARNr (Fraga et al., 2013 y Cerón, 2014). Sin embargo, estas técnicas demandan mucho costo, ya que para ello se necesita contar con tecnología sofisticada y conocimiento previo en biología molecular.

En este sentido, el presente proyecto de investigación pretende realizar el aislamiento y caracterización de la población bacteriana anaeróbica que habita el contenido del compartimento C1 del estómago de la alpaca, mediante métodos convencionales. Con la finalidad de contribuir al conocimiento de los microorganismos presentes en el C1 de la alpaca que se cría en el Altiplano peruano, asimismo poder comprender su biodiversidad, finalmente a futuro emplear el contenido ruminal de la alpaca como aditivo biológico fuente de bacterias y enzimas para la nutrición de los CSA de las regiones altoandinas quienes solo disponen de las praderas naturales de la zona para su alimentación.

2.2 Objetivos

2.2.1 *Objetivo General*

- Aislar y caracterizar las bacterias anaerobias del compartimento C1 de la alpaca, mediante métodos convencionales.

2.2.2 *Objetivos Específicos*

- Caracterizar fenotípicamente las bacterias anaerobias aisladas del compartimento C1 de la alpaca.
- Identificar las bacterias anaerobias aisladas a partir del compartimento C1 de la alpaca, mediante las pruebas bioquímicas.

III. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis General

H₀: El aislamiento y caracterización de las bacterias anaerobias del compartimento C1 de la alpaca, se puede realizar mediante métodos convencionales.

H₁: El aislamiento y caracterización de las bacterias anaerobias del compartimento C1 de la alpaca, no se puede realizar mediante métodos convencionales.

3.2 Hipótesis Especifico

Hipótesis específico 1

H₀: Las bacterias anaerobias aisladas a partir del compartimento C1 de la alpaca se pueden caracterizar fenotípicamente mediante pruebas convencionales.

H₁: Las bacterias anaerobias aisladas a partir del compartimento C1 de la alpaca no se pueden caracterizar fenotípicamente mediante pruebas convencionales.

Hipótesis específico 2

H₀: Las pruebas bioquímicas, pueden ser usadas para identificar las bacterias anaerobias partir del compartimento C1 de la alpaca.

H₁: Las pruebas bioquímicas, no se pueden usar para identificar las bacterias anaerobias partir del compartimento C1 de la alpaca.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 Bases Teóricas

Alpaca

La alpaca es un mamífero doméstico de la familia de los camélidos, son animales esbeltos, cubiertos de fibra que en su conjunto se denomina vellón, armoniosa en su caminar. Presenta almohadillas plantares, características que le otorga la condición de animal ecológico al no dañar el pasto, ni provocar erosiones del suelo (Alfaro, 2018).

Habitad y Distribución de las Alpacas

Las alpacas son animales mamíferos, que previa a la conquista de los españoles se distribuía únicamente a nivel de América del sur. Pero hoy en día se encuentra distribuida en casi todo el mundo, por su gran capacidad de adaptación a los diferentes ecosistemas, llegando a habitar a cualquier altura, desde el nivel del mar hasta a altitudes superiores a 5000 msnm, pero generalmente habitan en regiones altoandinas, donde las fuertes fluctuaciones de temperatura y precipitaciones pluviales es una de las mayores limitantes más importantes para el desarrollo pecuario de otras especies y la agricultura (Cruz, 2018).

Población

Según el último censo nacional agropecuario (CENAGRO, 2012), la población de alpacas en el Perú sería de 3. 685,5 millones de cabezas, siendo el (80%) de la población de alpacas de raza Huacaya, (12%) raza Suri y 7,3 % son animales híbridos, donde El 99% de la población de estas especies está concentrada en la sierra, siendo las regiones con mayor población nacional: Puno (56%), Cusco (15%) y Arequipa (13%) ((INEI), 2013).

Importancia

La importancia económica, social y cultural de los CSA para los habitantes altoandinos está bien documentada, es así que la alpaca se constituye como la especie doméstica económicamente más importante dentro de los CSA, debido a que su crianza encierra una serie

de actividades que son de vital importancia para la supervivencia de los pobladores altoandinos porque contribuyen a sus ingresos económicos y para la población en general quienes aprovechan su carne y fibra (Bustinza, 2001). En cuanto a los sistemas de producción de alpacas están constituido principalmente por pequeños y medianos productores, para los cuales la venta de fibra y carne de alpaca constituye un importante ingreso económico para la manutención de sus familias (Rodríguez, 2012). En ese mismo contexto, aproximadamente un promedio de 500 mil familias de la zona rural del Altiplano peruano y 2800 a 3000 familias argentinas, dependen de esta actividad pecuaria exclusivamente, donde no es posible la agricultura, ni la crianza convencional de otras especies de mamíferos (Avilés et al., 2018).

Desde otro punto de vista, los CSA han alcanzado un equilibrio con el medio ambiente, gracias a su alta tasa de conversión de la vegetación nativa consumida, transformándolos en carne, fibra, piel y cuero usados en la industria y en artesanía como productos principales, además, las alpacas hoy en día, gracias a su docilidad y fortaleza son utilizados como mascotas, guardianes, en el turismo (transporte y artesanías) (Avilés et al., 2018).

De igual manera la importancia de este estudio radica en la validación de las bacterias aisladas para ser usadas en otros trabajos de mejoramiento de la nutrición y alimentación ya sea en la inoculación de esas bacterias para el bienestar de las alpacas. Vale destacar que se pueden usar esas bacterias en situaciones clínicas donde la población bacteriana esta seriamente disminuida y los animales permanecen postrados, sin comer y por falta de una digestión microbiana.

Alimentación y Nutrición

Los CSA se diferencian de otras especies, porque tienen un patrón de comportamiento al pastoreo diferente, que les permite realizar el corte de los pastos sin arrancarlos, tal como lo hacen los ovinos, bovinos y caprinos, de esta forma conserva mejor el estrato herbáceo, facilitando el rebrote (Cerón, 2014).

Como si fuera poco, las alpacas se distinguen de otros rumiantes por poseer dientes inferiores y almohadilla dental superior, así como, la presencia de labios delgados, tienen una excelente movilidad que le permite la selección de los alimentos para cortar o tomar sin arrancarlos, facilitando así el rebrote de los pastos, asimismo, la presencia de almohadillas plantares en cada extremidad en lugar de pezuñas como el caso de otras especies, da como resultado la reducción al máximo del deterioro del pasto causado por el pisoteo (Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI), 2019).

Por otra parte, la alpaca es un animal exclusivamente herbívoro, donde la dieta está compuesta principalmente de especies forrajeras nativas con diferencias nutricionales, alto contenido de fibra y bajo contenido de proteína, las cuales son utilizadas para satisfacer sus requerimientos nutricionales, sin embargo, la composición de la dieta de los camélidos sudamericanos en su hábitat natural, en condiciones hostiles de frío y altura, depende de la disponibilidad (cantidad y calidad) del alimento, que varía según la época del año, carga animal y la selectividad individual (Raggi & Ferrando, 1998; Cerón, 2015).

De manera similar, algunos autores indican que, los CSA pueden sobrevivir consumiendo plantas de bajo nivel de proteína, debido a que poseen una alta eficiencia en el reciclaje de nitrógeno, manteniendo elevadas concentraciones de amonio en los dos primeros compartimentos del estómago, el cual es un excelente sustrato requerido por las bacterias celulolíticas para la síntesis de proteína microbiana (Zevallos, 2020).

También cabe señalar que, existen varios estudios de las diferencias entre las habilidades digestivas de los CSA y otras especies, realizados por diferentes autores en donde demostraron que los CSA digieren de manera más eficiente los forrajes fibrosos en relación con los ovinos, donde la mayor eficiencia ha sido atribuida al mayor tiempo de retención de la ingesta, mayor número de contracciones de los compartimentos y a una mayor habilidad de amortiguar el pH pre-gástrico (Ortiz, 2012).

Asimismo, en un estudio comparativo realizado, evaluaron el tiempo de retención del alimento entre llamas y otros mamíferos herbívoros, donde, demostraron que las llamas poseen un tiempo de retención mayor de partículas largas, lo que le permite degradar y utilizar todos los componentes celulares (Zevallos, 2020).

En esta misma línea, otros estudios indican que el tiempo de retención de alimento, es la cantidad de horas que permanece el alimento en el tracto digestivo (pre-estómagos, estómago e intestinos), demostrando que las alpacas presentan un mayor tiempo de retención de partículas sólidas de la digesta en comparación a las ovejas (50,3 vs 43,2 h., respectivamente; Flórez, 1973), resultados coincidentes con estudios realizados en llamas por (Clemens y Stevens, 1980; San Martín, 1987), mientras, la tasa de pasaje de la fase líquida es mayor en llamas (10,4%/h) en comparación con las ovejas (7,7%/h) (San Martín, 1987), resultados que coinciden con los estudios publicados por (Clemens y Stevens, 1980; Heller *et al.*, 1986) (Ortiz, 2012).

Asimismo, estudios realizados sobre consumo y tolerancia a la privación de agua, refieren que las alpacas y llamas presentan menor consumo de agua en comparación con el ovino, este menor consumo observado en los camélidos se explica principalmente al menor consumo de materia seca. Mientras tanto, la relación consumo de agua y consumo de materia seca, cuando se hacen comparaciones entre las alpacas y los ovinos, se observa que tienen una relación semejante (Cerón, 2014).

Por otro parte, el consumo de materia seca en alpacas es de 1,8 a 2% de peso vivo, este menor consumo de alimento se debe a que las alpacas presentan menor requerimiento de energía, además de que son animales menos selectivos a la hora de tomar su alimento, no solo eso, sino que también presentan mayor tiempo de retención del alimento (Ccanccapa, 2020)

Anatomía y Fisiología Digestiva

Las alpacas, al igual que otros camélidos son herbívoros que poseen un estómago policavitario, constituido por tres compartimentos, con distintas áreas glandulares en cada uno de ellos, lo cual marca una gran diferencia con los rumiantes (Carrica et al., 2019) donde el compartimento C1 comprende el 83 % del volumen total del estómago, considerada la más grande de los tres y está dividido en tres porciones, una craneal y otra caudal, por un pliegue muscular transversal. El C2 comprende el 6% del volumen total del estómago, considerada como el más pequeño y es la continuación del C1. El C3, que es originada en C2, comprende el 11% del volumen total del estómago y está situado en el lado derecho del C1 y tiene una forma tubular y alargada (Cerón, 2015).

No obstante, los compartimentos C1 y C2 están implicados en los procesos de fermentación, donde la absorción de nutrientes por los procesos de fermentación en alpacas es 2 a 3 veces mayor que la observada en el rumen de rumiantes, asimismo estos compartimentos se destacan por la presencia de sacos glandulares que les permite una eficiente maceración, mezclado y absorción de la digesta (Cerón, 2014; Ccancapa, 2020). Por otro lado, cabe mencionar que la población de bacterias acetogénicas es mayor en los dos primeros compartimentos de los camélidos con relación a los rumiantes, sin embargo, no se reportaron diferencias entre los ácidos grasos volátiles producidos entre camélidos y rumiantes, pero si en la tasa de absorción; siendo mayor en los primeros compartimentos de los camélidos, manteniendo niveles constantes de pH que favorecen la fermentación microbiana constante. Mientras tanto en el compartimento C3, la fermentación microbiana solo ocurre en la porción proximal de este, mientras que en la porción distal se secretan enzimas proteolíticas y ácido clorhídrico (Zevallos, 2020).

Microbiología del Compartimento C1 de la Alpaca

Muchos de los microorganismos que se encuentran en la naturaleza son inofensivos para el hombre, animales o plantas. Es así como, muchas bacterias y hongos realizan una

contribución importante a las actividades biológicas que tienen lugar en el suelo, en el agua y en el tracto digestivo de los animales. Por ello la comunidad bacteriana juega un papel importante en el mantenimiento y modulación de la enfermedad (Quinn et al., 2005; He et al., 2018).

Los animales como rumiantes presentan una población de microorganismos simbioses (bacterias, protozoos y hongos) donde la mayoría de estos microorganismos son anaerobios estrictos, algunos son anaerobios facultativos; y son las responsables de la fermentación de los alimentos ingeridos por el animal convirtiéndolos en ácidos grasos volátiles (AGV), dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), amoníaco (NH_3), y sobre todo proteína microbiana para la nutrición de los animales, o para su depuración (Roque, 2012).

Los CSA son capaces de digerir materias vegetales gracias a que el compartimento C1, posee un ecosistema microbiano denso, complejo, anaerobio, dinámico, resiliente y redundante que incluye bacterias, protozoos, arqueas y hongos. Las cuales, son las responsables de la fermentación del forraje consumido, proceso fundamental para la nutrición animal. Sin embargo, el contenido del compartimento C1 de CSA se encuentra pobremente caracterizado, en gran medida debido a la dificultad que involucra trabajar con los microorganismos anaerobios estrictos que lo habitan (Cerón, 2015).

Bacterias Ruminales

Las bacterias se definen como los microorganismos más pequeños, antiguos, abundantes y diversos del mundo y están compuestas típicamente de capsula, pared celular, membrana celular (citoplasmática), citoplasma con contenido material nuclear y apéndices tales como los flagelos y fimbrias, y algunas especies de bacterias pueden producir formas denominadas esporas o endosporas, que son estructuras resistentes a las condiciones ambientales (Quinn et al., 2005).

Las bacterias ruminales, son en gran número anaerobias estrictas, pero también existen bacterias anaerobias facultativas que están adheridas a las paredes del rumen, las mismas que utilizan el O₂ proveniente del torrente sanguíneo (Guerrero, 2011). Asimismo, la comunidad microbiana ruminal cuenta con varios cientos de especies bacterianas, siendo en su gran mayoría bacterias anaeróbicas estrictas o facultativas y al menos 30 de ellos son los más predominantes con cantidades de aproximadamente 10¹¹ células bacterias/ML de flujo ruminal, sin embargo, solo una fracción de la comunidad bacteriana es cultivable, donde, en el caso del rumen, se estima que solo 10 y 50% de la comunidad bacteriana total puede ser cultivada en medios artificiales (Fraga et al., 2013), debido a que las condiciones de anaerobiosis en el que viven estos microorganismos ruminales, dificultan realizar el proceso de aislamiento.

Estudios realizados sobre ecosistema ruminal en los rumiantes, reportaron que: El ecosistema ruminal está compuesto por bacterias (más de 200 especies, con una concentración media de 1×10¹⁰ bacterias/mL), arqueas metanogénicas, protozoos (más de 20 especies, con cifras de 1×10⁶ protozoos/mL) y hongos (con densidades que alcanzan las 1×10⁴ zoosporas/mL) (Joblin, 1981), asimismo, en los últimos años, las bacterias fibrolíticas del rumen (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus*), han sido ampliamente estudiados y se ha demostrado que tienen un papel importante en la digestión de la fibra (Ortiz, 2012, p. 24).

Función de las Bacterias Ruminales

Las bacterias ruminales son las encargadas de realizar diversas funciones vitales para el bienestar de los animales: como fermentar el material vegetal consumido en AGV, CO₂ y CH₄, asimismo sintetizan vitaminas necesarias para los rumiantes y algunas bacterias degradan los componentes tóxicos de la dieta del animal. Por otro lado, la fermentación ruminal, está vinculada al crecimiento microbiano y las proteínas sintetizadas son la mayor fuente de proteína para los rumiantes (Guerrero, 2011).

Nutrición y Crecimiento de las Bacterias.

Las bacterias, como todos los seres vivos deben adquirir sus nutrientes a partir de su medio ambiente inmediato, con la finalidad de obtener energía para la síntesis y el funcionamiento celular, donde el requerimiento mínimo de nutrientes, para el crecimiento son una fuente de carbono, nitrógeno, una fuente de energía, oxígeno, agua y diversos iones (Guerrero, 2011).

Las fuentes de carbono y energía, los microorganismos los obtienen a través de la fotosíntesis o de la oxidación de compuestos inorgánicos, los cuales son capaces de utilizar el anhídrido carbónico como fuente principal de carbono (denominados autótrofos), por otro lado, todos los demás microorganismos obtienen el carbono celular principalmente a partir de nutrientes orgánicos, los cuales se utilizan como fuente de carbono y energía (Schlegel, 1997).

Clasificación de las Bacterias

Las bacterias ruminales pueden clasificarse desde varios puntos de vista. Por su forma, se clasifican en cocos y bacilos, por la coloración, en Gram positivos y Gram negativos; taxonómicamente, en *Ruminococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Selenomonas*, *Succinomonas*, *Anaerovibrios*, *Butirovibrios*, *clostridios*, *Metanobacterium*, etc (Roque, 2012).

Asimismo, según sus funciones específicas las bacterias presentes en el rumen se clasifican: Bacterias celulolíticas, hemicelulolíticas, aminolíticas, bacterias que utilizan azúcares, bacterias proteolíticas, bacterias productoras de amonio, bacterias que producen metano, lipolíticas, bacterias sintetizadoras de vitaminas (Ccanccapa, 2020).

Bacterias Celulolíticas

Las bacterias celulolíticas tiene la capacidad para degradar los hidratos de carbono poliméricos a compuestos sencillos como los ácidos grasos y los alcoholes. Las bacterias principalmente degradan celulosa a través de un complejo enzimático celulósico (bacterias

anaerobias) y por la excreción de las celulasas extracelulares (bacterias aeróbicas) (Guerrero, 2011). Asimismo, este tipo de bacterias se encuentran en concentraciones altas en el rumen de animales alimentados con forrajes que contienen mucha fibra. Muchas de las bacterias de este grupo también degradan el almidón (Llamas, 2011; Carhuapoma et al., 2022).

Entre las bacterias representativas de este grupo tenemos: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus* que han sido descritos en los rumiantes (Weimer 1996a; Weimer 1996b; Karma 2005, citado por Cerón, 2014).

Bacterias Hemicelulolíticas

Las bacterias hemicelulolíticas, son bacterias capaces de degradar la hemicelulosa (componente importante de las paredes celulares de las plantas), liberando las pentosas, hexosas y ácidos úricos, convirtiéndolos en glucosa o fructosa (Llamas, 2011).

Entre las bacterias representativas de este grupo tenemos: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides ruminicola* y *Ruminococcus spp* (Guerrero, 2011).

Bacterias Amilolíticas

Este tipo de bacterias, poseen enzimas amilolíticas que aseguran la conversión de materiales amiláceos en ácidos grasos volátiles (Guerrero, 2011). Para ello emplean los almidones como sustrato, donde la enzima amilasa hidroliza enlaces alfa 1-4 produciendo maltosa, que por acción de la maltasa se convierte en glucosa (Llamas, 2011).

Las bacterias amilolíticas se encuentran en el rumen, en mayor cantidad cuando la dieta del rumiante es rica en almidón Las bacterias celulíticas tienen la capacidad de digerir almidón, sin embargo, algunos microorganismos amilolíticos no pueden utilizar celulosa. Entre las especies bacterianas más importantes degradadores de almidón tenemos: *Bacteroides Amulophilus*, *Succinomonas amylophilica*, *Butyrivibrio fibrosolvens*, *Lachnospira multiparus* y *Bacteroides ruminicola* (Guerrero, 2011).

Bacterias Proteolíticas

Las proteínas de las plantas digeridas por los rumiantes son degradadas principalmente por las bacterias proteolíticas del rumen, mediante la producción de enzimas hidrolíticas que rompen los enlaces peptídicos, de esta manera liberan los péptidos y finalmente ácidos aminados (Llamas, 2011). Las especies bacterianas proteolíticas más importantes, tenemos: *Prevotella spp.*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Lachnospira múltipara* y *Ruminobacter amylophilus* (Wallece & McKain 1991, como es citado en Cerón, 2014).

Bacterias Lipolíticas

Las bacterias lipolíticas presentan esterasas que hidrolizan a los triglicéridos, fosfolípidos y esteres de ácidos grasos (Llamas, 2011). Por otro lado, otro autor indica que las bacterias lipolíticas producen la enzima lipasa, que se encarga de catalizar la hidrólisis de las grasas o ácidos grasos y el glicerol. No obstante, las bacterias del rumen participan activamente en la hidrogenación de los ácidos grasos insaturados de cadena larga y son responsables de la composición constante de la grasa corporal de los rumiantes (Guerrero, 2011).

Bacterias Metanogénicas

Las bacterias metanogénicas son las responsables de regular la fermentación total en el rumen, mediante la eliminación del hidrogeno gaseoso (H_2), mediante la formación de (CH_4). Asimismo, promueven el crecimiento de otras especies bacterianas en el rumen y permiten una fermentación más eficaz. Donde la reducción de CO_2 con H_2 gaseoso es el método primario, mediante el cual se producen el metano en el rumen. Algunas de las bacterias metanogénicas son: *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum* y *Metahanomicrobium mobile* (Guerrero, 2011).

Bacterias que Utilizan Ácidos Intermedios

Las bacterias que utilizan ácidos intermedios en el rumen dependen de la actividad de las anteriores, que son las que producen glucosa, xilosas y otros azúcares solubles a partir de

las celulosas, almidones, hemicelulosas, etc., transformándolas en ácidos grasos volátiles (Llamas, 2011).

Tabla 1

Características de Algunas Bacterias Anaerobias Ruminales

Bacteria	Morfología	Coloración Gram	Motilidad	Sustrato	Aerotolerancia	Referencia
<i>Ruminococcus spp.</i>	cocos	+	-	Celobiosa, Sacarosa, Xilosa, Glucosa, Arabinosa, Lactosa, Manosa, Manitol	-	Londoña et al., 2019 y Cerón, 2013
<i>Fibrobacter spp.</i>	bacilos	+	-	Celulosa, Xilano, Hemicelulosa	-	Londoña et al., 2019 y Cerón, 2014
<i>Bacteroides spp.</i>	cocobacilos/ bacilos	-	-		-	Londoña et al., 2019 y Cerón, 2015
<i>Butirivibrio sp.</i>	Bacilar ligeramente curvo	-	+	Glucosa, Celobiosa, Maltosa, Xilano, Pectina	-	Cerón, 2014
<i>Pseudobutirivibrio ruminis</i>	Bacilar ligeramente curvo	-	+	Glucosa, Celobiosa, Maltosa, Xilosa d+, Pectina	-	Cerón, 2014

Métodos de Aislamiento e Identificación Bacteriana

El aislamiento se define como un conjunto de métodos que se deben aplicarse para conseguir bacterias en cultivo puro, a través de la separación de las bacterias que se desean estudiar del resto de microorganismos contaminantes (Stanchi, 2007).

También cabe mencionar que, el aislamiento del cultivo puro tiene lugar, sobre o en medios sólidos, como también se pueden realizar en medios líquidos. Ello dependerá de la predominación de microorganismos presentes en el material de partida (Schlegel, 1997).

Sistemas de Incubación en Anaerobiosis

Con respecto al sistema de incubación en anaerobiosis, su elección viene determinada por el coste, número de cultivos y limitaciones de espacio, siendo las más comunes las cámaras, jarras o cajas y bolsas de anaerobiosis, además que, en estos sistemas es importante monitorizar

la temperatura y el ambiente anaerobio con un indicador de oxígeno, como las tiras de azul de metileno o de resazurina, que se decoloran al desaparecer el oxígeno (Alcalá et al., 2004) .

Al mismo tiempo, el aislamiento de las bacterias anaerobias a partir del rumen se realiza principalmente por la metodología de roll tube, más conocido metodología de Hungate, este método es bastante utilizado para bacterias anaerobias estrictas ya que evita la posible existencia de oxígeno en el medio a comparación de otros extremadamente sensibles al oxígeno (Ríos, 2008).

Identificación de Bacterias

La identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales, puesto que su realización y coste los hace más asequibles. Asimismo, la identificación fenotípica bacteriana se basa fundamentalmente en la comparación de las características fenotípicas de bacterias desconocidas con aquellas de cultivos tipo. Por otro lado, para la identificación bacteriana es necesario realizar un estudio sobre las características tintoriales, morfológicas y bioquímicas (Fernández et al., 2010).

Cultivo Microbiológico

El cultivo microbiológico permite la identificación bacteriana a través de las características morfológicas y requerimientos para crecimiento de las diferentes especies de bacterias, donde la fiabilidad de la identificación está en proporción directa al número de características semejantes bacterianas presentes (Rodríguez, 2012), sin embargo, la gran complejidad de especies presentes en diferentes tipos de ecosistema, como el rumen o estómago de los animales, así como las diferentes condiciones y requerimientos nutricionales para su cultivo no han permitido una completa y correcta caracterización de las especies bacterianas presentes.

Todas las características fenotípicas conocidas son importantes y hay que tenerlas en cuenta cuando se inicia el proceso de identificación. En este sentido en el proceso de

identificación bacteriana tradicional se establecen tres niveles de procesamiento: Primero se deberán seleccionar aquellas que se consideran pruebas primarias, que son rápidas y sencillas de realizar, como la morfología en la tinción de Gram u otras tinciones, crecimiento en diferentes atmósferas de incubación como las condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, crecimiento en varios tipos de medios de cultivo, oxidasa y catalasa, fermentación de glucosa, producción de esporas y movilidad. En el segundo nivel de identificación se debe especificar el género, grupo de géneros o en algún caso familia a la que pertenece un aislamiento, donde la identificación se apoya en las características del cultivo y en las pruebas primarias. Por último, para la identificación tradicional a nivel de especie, se debe emplear ciertas pruebas bioquímicas que permitan la identificación con un alto grado de precisión la mayoría de las bacterias clínicamente significativas (Fernández et al., 2010).

Características Morfológicas

Las características morfológicas de las colonias son fundamentales en la identificación preliminar y para la diferenciación de los microorganismos, donde el aislamiento de las bacterias en cultivo puro, compuesta por un solo tipo de microorganismo es imprescindible a la hora de realizar la identificación. Las colonias de una única especie, cuando crecen en medios específicos y bajo condiciones idóneas se describen por sus características de tamaño, forma, consistencia, y a veces por su color (Fernández et al., 2010).

Por otro parte, la forma de las bacterias es muy variada y, a menudo, una misma especie adopta distintos tipos morfológicos, lo que se conoce como polimorfismo. Es así que las bacterias del rumen se encuentran representadas por una variedad de géneros y especies y una diversidad de formas como: cocos, bacilos, vibrios, espirilos, espiroquetas, rosetas ovales y tetracocos, que se distribuyen en Gram positivas y Gram negativas (Cahuana, 2012).

Características Tintoriales

La identificación por coloración permite conocer los detalles morfológicos de la bacteria, existen varias técnicas empleadas.

La tinción de Gram, Fue desarrollada por el científico danés Hans Christian Gram en 1884; hoy en día, sigue siendo una de las tinciones más utilizadas universalmente debido a lo económico, sencillo y eficaz que resulta, porque permite distinguir entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas, debido a la diferencia de la estructura química que existe en la pared celular de las bacterias (López et al., 2014).

Las bacterias Gram positivas, se tiñen de color azul, puesto que poseen una pared celular relativamente gruesa y uniforme que está compuesta principalmente por peptidoglicano y ácidos teicoicos, mientras que las bacterias Gram negativas se tiñen de color rojo, debido a que poseen una pared celular constituida por una capa fina de péptidoglicano y una membrana externa (compuesta de moléculas de lipopolisacáridos) (Quinn et al., 2005).

Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas permiten la identificación bacteriana mediante el estudio de características bioquímicas generales presentes en los diferentes sistemas metabólicos bacterianos, mediante la identificación de enzimas, sustratos, vías metabólicas (fermentación), proteínas, productos de secreción-excreción (ácidos grasos, proteínas, etc.) específicos para ciertos géneros y/o especies bacterianas (Rodríguez, 2012).

Por otro lado, En diferentes estudios emplearon la prueba bioquímica como el método tradicional para clasificación de las bacterias ruminales según identificación de género y especie, donde se han identificado diferentes grupos de bacterias que presentan actividad celulolítica, amilolítica, pectinolítica y hemicelulolítica.

Entre los principales género/especies encontramos: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavafaciens*(Hungate 1950; Hungate 1966), *Butyrivibrio fibrisolvens* (Bryant & Small 1956a), *Eubacterium cellulosolvens* (Bryant et al. 1958a),

Prevotella rumicola (Bryant *et al.* 1958b; Cotta 1992) *Succiniclasticum ruminis* (Van Gylswyk 1995), *Pseudobutyrvibrio ruminis* (Van Gylswyk *et al.* 1996) y *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* (Kopecny *et al.* 2003), *Streptococcus bovis* (Hungate *et al.* 1966), *Selenomona ruminantium* (Bryant 1956; Hungate *et al.* 1966; esta bacteria fue anteriormente denominada *Ancyromonas ruminantium* por Certes (1889), *Megasphaera elsdenii* (Gutierrez *et al.* 1959; Wallace 1986; Marounek *et al.* 1989) y *Succinomonas amylolytica* (Bryant *et al.* 1958a). Estas bacterias interactúan entre sí y con otros grupos de microorganismos obteniendo un efecto sinérgico para la degradación del forraje consumido por los animales (Cerón, 2014).

Entre las pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias ruminales empleadas en diferentes estudios tenemos: prueba de Kligler, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno, prueba de citrato, prueba con el medio de SIM, catalasa, Rojo de metilo y Voges Proskauer (Guerrero, 2011; Cahuana, 2012).

Prueba de la Catalasa

La prueba de la catalasa se emplea para comprobar la presencia de la enzima catalasa presente en la mayoría de los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos que poseen el citocromo oxidasa. La enzima catalasa cataliza la separación del peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas. la aparición de burbujas en la prueba indicara que los microorganismos son catalasa positiva, mientras que, por otro lado, si no se observa ningún cambio en la prueba será catalasa negativa (MacFaddin, 2003) .

Prueba de la Oxidasa

La prueba de la oxidasa se rige en la producción bacteriana de la enzima oxidasa, donde la reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa, que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que su vez actúa como aceptador de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones (MacFaddin, 2003).

. Cabe señalar que el sistema citocromo oxidasa solo se encuentra en las bacterias

aerobias, mientras que las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa, porque no presentan el sistema citocromooxidasa y no pueden vivir en presencia de oxígeno.

Por tanto, un resultado oxidasa positivo, está formado por una serie de reacciones en el cual un componente auto oxidable del sistema citocromo es el catalizador final. Donde los aceptadores de electrones naturales pueden sustituirse con aceptadores artificiales (parafenilendiamina y el indofenol), en cualquier sitio de cadena de transporte de electrones, los mismos que actúan como reductores del sistema citocromooxidasa.

Estos sustratos o aceptadores artificiales son incoloros o coloreados, según el estado en el que se encuentran, la reacción oxidasa final muestra un producto coloreado.

Agar Hierro de Kligler o Prueba de Kligler

El medio Kligler contiene como sustrato, dos hidratos de carbono como la glucosa y la lactosa. Se emplea para determinar la capacidad de un microorganismo de atacar un hidrato de carbono específico adicionado al medio de cultivo, con producción o no de gases, sumado a la determinación de posible producción de ácido sulfhídrico.

La capacidad de atacar un hidrato de carbono dará lugar a la formación de ácidos que bajen el pH de medio, por ende, el rojo fenol vira a amarillo. Cuando el microorganismo sea capaz de fermentar glucosa, se observará viraje de color amarillo en el fondo del tubo inclinado, y si el microorganismo es capaz de fermentar la lactosa, se observará viraje a color amarillo en la superficie del tubo inclinado. Pero si el microorganismo no es capaz de fermentar ninguno de los sustratos, la prueba será negativa, si el tubo no cambia de color, permaneciendo de color rojo fenol. Por otro lado, la producción o no de gases se determinará por la aparición de burbujas, rotura o elevaciones del agar del fondo del tubo, mientras la producción de ácido sulfhídrico (SH₂), se determinará por la aparición de un precipitado de color negro en el fondo del tubo (MacFaddin, 2003).

Prueba de Citrato Simmons

Medio de cultivo que sirve para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales para el metabolismo, provocando una alcalinización del medio.

Algunas bacterias pueden suministrar energía en ausencia de fermentación o producción de ácido láctico empleando el citrato como única fuente de carbono.

Este medio de cultivo contiene como sustrato citrato de sodio y fosfato de amonio como únicas fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente y el azul de bromotimol como indicador de pH. En este sentido solo las bacterias capaces de metabolizar el citrato como única fuente de carbono, podrán multiplicarse en este medio y utilizarán los fosfatos presentes liberando iones amonio lo que, juntamente con la eliminación del citrato (ácido), producirá una fuerte alcalinización del medio que será aparente por el cambio de color verde a color azul por el indicador de pH, entonces la prueba será positiva cuando en el medio, ocurra el crecimiento con un color azul intenso en el pico de flauta tras incubar 24 – 48 horas de incubación y por lo contrario si la prueba es negativa el medio permanecerá de color verde (MacFaddin, 2003).

Sin embargo, si se observa un crecimiento sin cambio de color, se tendrá que confirmar la positividad de la prueba sometiendo a 24 horas a más de incubación.

Prueba con Medio SIM

Esta prueba permite distinguir ciertas propiedades específicas que caracterizan algunas bacterias, mediante la ejecución de tres importantes pruebas: la producción del sulfuro de hidrogeno (H_2S) de los que no lo hacen, también destaca la formación de indol a partir del triptófano de las que no lo forman y finalmente permite evaluar la movilidad de las bacterias de las inmóviles.

Donde la prueba indol se utiliza para detectar la presencia de la enzima triptofanasa en las bacterias, mediante la liberación del indol en un cultivo bacteriano, esta liberación debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante la enzima triptofanasa. Mientras la

motilidad de las cepas se puede verificarse en este medio, por la turbidez que produce alrededor de la punción de siembra, por otro lado, las cepas productoras de sulfuro de hidrogeno se distinguen siempre que el medio se mantenga a un pH mayor a 7.2.

En cambio, la producción de indol: la prueba será positiva cuando se observe el desarrollo de color rojo luego de agregar el reactivo de Kovacks y si este no cambia de color la prueba será negativa. En cuanto a la producción de H₂S, la prueba será positiva cuando se observe un precipitado negro a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio, pero si el medio permanece sin cambio de color la prueba será negativa. Por otro lado, en cuanto a la motilidad, la prueba será positiva cuando se observe turbidez en medio y que se extienda más allá de la línea de siembra, en tanto que, la prueba será negativa cuando el crecimiento de las bacterias se observe solamente en la línea de siembra.

Por otro lado, cabe mencionar que, existen sistemas de identificación bioquímica disponibles comercialmente para identificación de entero bacterias como los kits BBL, ENTEROTUBE II (Becton Dickinson), OXI/FERM TUBE II, (Becton Dickinson), Quintet 3H y para la identificación de bacterias Gram negativas como el kit API 20 E (C. Rodríguez, 2012).

4.2 Antecedentes

Carhuapoma et al., (2022), Realizaron un estudio cuyo título fue bacterias fibrolíticas aisladas de rumen de alpacas, ovinos y vacuno con capacidad bio degradadora de celulosa, aislaron y evaluaron el potencial degradador in vitro de la celulosa de las bacterias ruminales celulolíticas de alpaca, ovino y vacuno con el objetivo de utilizar microorganismos degradadores de celulosa para su aplicación en biotecnología alimentaria. Para ello recolectaron muestras de líquido ruminal de ocho especímenes de alpaca, vacuno y ovino sin distinción de edad y sexo; del matadero municipal de Huancavelica-Perú, ubicado a 3820 msnm. Teniendo a la alpaca como especie comparativa principal de la investigación. Las muestras ruminales fueron cultivadas en medios con carboximetilcelulosa, enriquecidos con

caldo de infusión de cerebro corazón en condiciones aeróbicas y anaeróbicas hasta lograr desarrollo de colonias bacterianas. La caracterización microbiológica, bioquímica y análisis de producción de celulosas de cada aislado bacteriano usando el método de coloración de rojo Congo y la identificación de las bacterias ruminales lo realizaron mediante sus características macroscópicas (forma, color, borde, elevación y consistencia), microscópica (grupo y tinción Gram) y pruebas bioquímicas de triple Sugar Iron Agar (TSI), Agar Lisina-Hierro (LIA), Agar citrato de Simmons (SIMON), Sulfide Indole Motility (SIM), Voges-Proskauer y Catalasa. Y evaluaron el diámetro de los halos (mayor a 10 -14 mm) de degradabilidad de celulosa. Lograron hallar bacterias celulolíticas *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* y *Fibrobacter succinogenes* con alta capacidad de degradabilidad de celulosa. Dicho hallazgo indica que los líquidos ruminales de alpaca, vacuno y ovino son excelentes fuentes de bacterias productoras de celulosa con alta capacidad degradadora de celulosa.

Londoño et al., (2011), realizaron un estudio de cuantificación de bacterias celulolíticas anaerobias provenientes del rumen del ganado, , donde el objetivo fue comparar los métodos de cuantificación de crecimiento bacteriano, para ese estudio evaluaron tres métodos de cuantificación de crecimiento bacteriano: número más probable, recuento de células viables en placa y Roll – tube, con respecto a la densidad y diversidad de bacterias celulolíticas ruminales en muestras de contenido ruminal recolectadas a través de dos hembras de raza Holstein canuladas al rumen. Al realizar la comparación de los métodos de cuantificación de bacterias celulolíticas ruminales, como resultado observaron la correlación positiva, de tipo alta con significancia estadística (0,826; $p = 0,000$) entre la cuantificación de células viables por el método de Roll-Tube y la cuantificación en placa, y una correlación negativa y de tipo moderada débil entre la cuantificación de células viables obtenidas por el método del número más probable con el método Roll-Tube (-0,514; $p = 0,237$), y negativa y de tipo débil entre la cuantificación con el método de número más probable y recuento en placa (-0,374; $p = 0,147$).

Asimismo, evaluaron la diversidad de bacterias celulolíticas presentes en la muestra, por medio del análisis macroscópico y microscópico de diferentes colonias obtenidas del cultivo en medio sólido, tanto en el método de cuantificación de células viables Roll-tube como en las cajas de Petri utilizadas para el método de recuento de células viables en placa y en el caso del método de número más probable solo realizaron el análisis microscópico de muestras tomadas de los tubos con el medio líquido, de modo que, al determinar la flora predominante en cada método evaluado, observaron el predominio de cocos grampositivos, compatibles con bacterias del género *Ruminococcus spp.* en los cultivos de número más probable, asimismo en los cultivos obtenidos con el método Roll-tube, observaron bacilos grampositivos y bacilos gramnegativos en cadena o aislados, compatibles con bacterias ruminales de los géneros *Fibrobacter spp.* y *Eurobacter spp.*, también identificaron cocos grampositivos individuales y agrupados, compatibles con *Ruminococcus spp.* La misma que fue predominante en el método de recuento en placa, y adicionalmente observaron cocobacilos gramnegativos, probablemente del género *Bacteroides spp.* Demostraron que con el número más probable se detectó baja diversidad, mientras que los métodos de recuento de células viables en placa y Roll-tube mostraron consistencia respecto a densidad y diversidad de bacterias. En conclusión, los resultados obtenidos en dicho trabajo sugieren que la técnica de recuento de células viables en placa puede ser la más adecuada para cuantificar bacterias celulolíticas ruminales, ya que este método permitió en corto tiempo y sin procedimientos de siembra adicionales, la caracterización morfológica de las colonias, el análisis microscópico de las células, así como el aislamiento de las bacterias para la obtención de cultivos puros. Sin embargo, el método de Roll-tube es la técnica más empleada por distintos autores, en la microbiología anaerobia y especialmente en estudios de microbiología ruminal.

Mientras tanto, Fraga et al.,(2013) realizaron un estudio cuyo título lleva, caracterización de la microbiota bacteriana ruminal de un bovino a pastoreo mediante técnicas

clásicas e independientes del cultivo donde sus objetivos fueron caracterizar la microbiota bacteriana ruminal cultivable y no cultivable asociada a las fracciones sólida y líquida del contenido ruminal de un bovino a pastoreo, asimismo aislar y clasificar bacterias capaces de crecer en un medio de cultivo con celulosa como principal fuente de carbono y energía. Para evaluar el microbiota cultivable utilizaron medios de cultivo artificiales, mientras que, para el análisis de la comunidad microbiana total emplearon la técnica de Fluorescent in situ hybridization (FISH). Como resultado identificaron 16 aislamientos incluyendo miembros de los géneros *Butyrivibrio*, *Pseudobutyrvibrio*, *Succinivibrio* y *Selenomonas* además de otros 4 que representan nuevas especies y géneros bacterianos.

Llamas et al., (2013) desarrollaron un estudio de aislamiento e identificación de la microflora bacteriana ruminal en vacas Holstein, alimentadas con subproductos de cervecería, donde el objetivo de ese estudio fue realizar la identificación bioquímica y molecular de los microorganismos del rumen bovino de vacas Holstein alimentadas con subproductos de cervecería y crear un cepario de bacterias aisladas del rumen de estas vacas, dicho trabajo de investigación se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coah., México. Para ello, utilizaron 16 vaquillas (primíparas), con un peso promedio de 450 kg y 16 vacas (multíparas) con 650 kg de peso promedio, de la raza Holstein. Asimismo, los animales se alimentaron durante 120 días con una dieta balanceada con residuos agroindustriales de la industria cervecera (masilla y levadura) en cuatro tratamientos (T1: testigo; T2: masilla 14 %; T3: masilla 13 % y levadura 6 %; T4: levadura 9 %). Como parte del trabajo el aislamiento lo realizaron en placas con medio sólido de agar nutritivo y agar Schaedler, donde Las cajas petri, inoculadas con los microorganismos, se pusieron en incubación a 40 ± 2 °C en condiciones anaerobias (jarra de anaerobiosis), también trabajaron en la proliferación de bacterias celulolíticas, proteolíticas, quitinolíticas y xilolíticas. Para ello, obtuvieron el líquido ruminal mediante una sonda oro-ruminal conectado a una bomba de vacío, el cual se utilizó como

inóculo inicial para la identificación y cultivo de células procariotas para su posterior caracterización, para ello emplearon varias técnicas como la caracterización macroscópica mediante la observación directa el crecimiento bacteriano, mientras que la caracterización microscópica lo realizaron mediante la tinción de Gram. Posteriormente llevaron a cabo una identificación bioquímica de las cepas puras, por medio de pruebas bioquímicas convencionales y finalmente, la identificación molecular se siguió mediante PCR. Logrando como resultado del trabajo aislar e identificar 38 microorganismos, 20 de ellos por técnicas moleculares (PCR), lo cual representa una fuente de aplicaciones biotecnológicas para la producción de enzimas, mejoramiento de dietas y bioprocesos. Asimismo, crearon un cepario de bacterias aisladas del rumen de estas vacas.

Por otra parte, Guerrero (2011), realizó un estudio cuyo título fue Aislamiento de bacterias ruminales degradadoras de celulosa con el objetivo de aislar e identificar bacterias con actividad celulítica, a partir del líquido ruminal de bovinos faenados en el Camal de la empresa Municipal de Rastro y Plazas de ganado del Cantón Cuenca, donde la metodología consistió en obtener el líquido ruminal partir del rumen de bovinos faenados, para el aislamiento e identificación de las bacterias, emplearon pruebas bioquímicas y caracterización morfológica en el laboratorio de la Universidad Politécnica Salesiana, lograron identificar 4 cepas de bacterias aisladas anaerobias del rumen del bovino, degradadoras de celulosa, identificadas como *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes* y *Fibrobacter succinogenes elongata*. Cabe señalar que, para la determinación de la actividad celulolítica de las bacterias, en el estudio el autor empleo aserrín de madera como sustrato, en un caldo de cultivo nutritivo y el inóculo de las bacterias aisladas, donde la evaluación de la actividad de la degradación de celulosa se hizo a través de la medición sucesiva a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas de inoculación. Donde llegó a la conclusión de que la degradación presentada por las bacterias aisladas, fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$), sin embargo

en el estudio el autor, evidenció un bajo rendimiento en la degradación de aserrín, que podría estar directamente relacionado con el tipo de sustrato y los medios de cultivo empleados, asimismo estos no incluyen todas las condiciones fisicoquímicas y nutritivas presentes en el rumen, así como la falta de interacciones con otros microorganismos que estimulan la actividad celulolítica de las bacterias.

V. DISEÑO Y METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

5.1 Tipo y Diseño de la Investigación

El tipo de investigación realizada fue de tipo cualitativa, ya que, mediante el estudio, se pretende aislar y caracterizar las diferentes especies de bacterias anaerobias del contenido del compartimento C1 de las alpacas criadas bajo un ecosistema de puna húmeda, de acuerdo con sus características fenotípicas y pruebas bioquímicas convencionales aplicadas a las colonias aisladas.

5.2 Ubicación Espacial y Temporal de la Investigación

El presente trabajo de investigación se realizó en el centro de investigación y producción (CIP) La Raya de la Universidad Nacional de Altiplano (UNA-PUNO), facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ubicado en el distrito de Santa Rosa, provincia de Melgar del departamento de Puno, con una extensión aproximada de 5 905,87 Has, a una altitud de 4,200 m.s.n.m. Corresponde a la zona agro ecológica de puna húmeda, donde la temperatura media es de 6,6 °C (con rango de - 10°C a 17°C), con precipitación pluvial de 525.7 mm (SENAMHI, 2019).

Coordenadas Geográficas

- Latitud sur: 10° 13' 33''
- Longitud oeste: 70° 57' 12''

Vías de Acceso:

- Vía Ferrocarril.
- Carretera asfaltada de Cuzco – Puno.



Figura 1. *Ubicación Satelital del CIP La Raya Puno*

Fuente: Google maps.

5.3 Materiales y Equipos

Materiales

- Guantes de látex
- Mascarillas
- Mandil
- Equipo de disección
- Papel aluminio
- Bolsas de polipropileno
- Bol acero inoxidable
- Pabilo
- Cernidor acero inoxidable
- Matraz de 500 mL
- Probeta graduada de 500 mL
- Gasa Estéril
- Tubos de ensayo con tapa de goma
- Puntas estériles de 1mL, 200 microlitros

- Puntas de siembra/aguja de colle
- Placas Petri
- Beakers de 50 mL.
- Tubos colectores de 10 y 50 mL
- Micropipeta de 100 a 1000 microlitros
- Mechero de alcohol
- Gradillas
- Laminas porta objetos



Figura 2. *Materiales de Laboratorio*

En la figura 2, se muestra algunos materiales de laboratorio que se utilizaron en el presente trabajo.

Equipos

- Jarra de anaerobiosis
- Cocina eléctrica
- Centrífuga para tubos de 50 mL
- Autoclave
- Estufa
- Balanza
- Incubadora de placas
- Microscopio

Sustancias

- Agua destilada
- Solución de lavado (Cloruro de sodio 0.09 %, Twin al 0.05%).
- Alcohol de 96°
- L-cysteina

Reactivos

- Cristal violeta
- Solución de yodo (Lugol)
- Alcohol-acetona
- Safranina
- Reactivo de Kovacs (detección de indol bacteriano)
- Agua oxigenada al 30% (prueba catalasa)
- Tiras de reactivos de la prueba de la oxidasa

Medios de cultivo

- Agar sangre Columbia
- Agar brewer anaerobic
- Sobres de anaerobiosis BBL (gaspak)
- Agar hierro de Kliger (KIA)
- Agar citrato de Simmons
- Medio SIM

5.4 Población y Muestra

La cantidad de alpacas para la investigación se determinó mediante la técnica de muestreo no probabilístico intencional, conformado por 4 alpacas de sexo macho, 3 a 4 años de edad, raza Huacaya destinadas a camal, las mismas que fueron criadas en el Centro de

Investigación y Producción La Raya de la UNA-Puno, cuyo sistema de crianza es de tipo extensiva utilizando las praderas naturales de la región altiplánica para su alimentación.

El tamaño de muestra empleados para el presente estudio fue según criterio teniendo en consideración el tipo de estudio (biológico) y disponibilidad de recursos (medios y materiales de laboratorio), llegándose a utilizar 14 muestras a partir de licor ruminal y 20 muestras a partir de la pared del Compartimento C1 del tracto digestivo.

Metodología de la Investigación

5.4.1 Toma de Muestra

Para la obtención de muestras se procedió a recuperar el tracto digestivo de las alpacas recientemente beneficiadas las mismas que fueron trasladados a laboratorio para ser procesadas y obtener las muestras (Ver, Figura 3).



Figura 3. *Recuperación del Tracto Digestivo de un Alpaca Recientemente Beneficiada*

Del compartimento C1 del tracto digestivo de la alpaca, se colectó aproximadamente 500 g del contenido encontrado, los cuales fueron mezclados y tamizados con gasa estéril para obtener 20 mL de licor (Ver, Figura 4-A). En seguida, el licor fue diluido en la proporción de 1:10 con una solución (NaCl 0,09%). La misma que se colocó en tubos colectores de 15 mL para ser

centrifugados a 3500 rpm por 30 minutos (Ver, Figura 4-B). El precipitado bacteriano obtenido se colocó en tubos Eppendorf para su cultivo inmediato (Cerón, 2014).

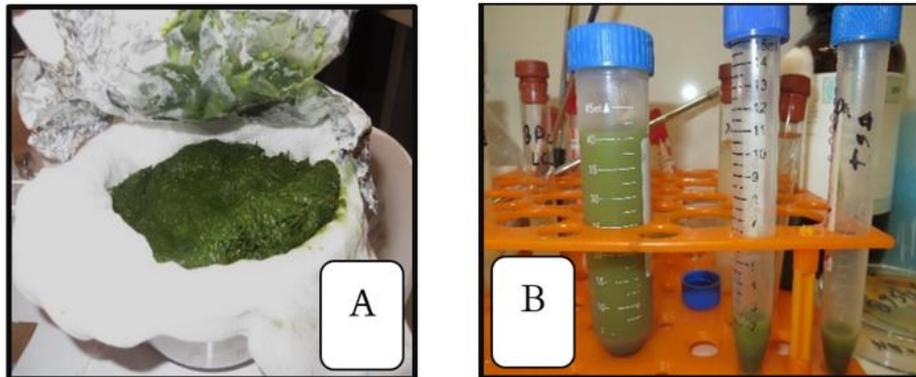


Figura 4. *Recolección de Licor Ruminal a través del Tamizaje del Contenido Ruminal*

5.4.2 *Aislamiento de Bacterias Anaerobias*

Inicialmente el aislamiento de bacterias anaerobias del compartimento C1 del tracto digestivo de la alpaca, se realizó a partir del precipitado bacteriano obtenido de licor (LC1) (Ver. Figura 5-A) y pared (PC1) del mismo compartimento C1 (ver. Figura 5-B), en placas Petri con medio de cultivo de Agar Sangre Columbia (OXOID) suplementado con L-cysteina (0.05%) prerreducidos recientemente preparados, mediante la técnica de doble capa, considerando que en la primera capa se realizó una siembra por estría en agotamiento con el uso del asa de kolle, para inmediatamente verter agar fundido y enfriado a 50°C (Thatcher & Clarck, 1973).

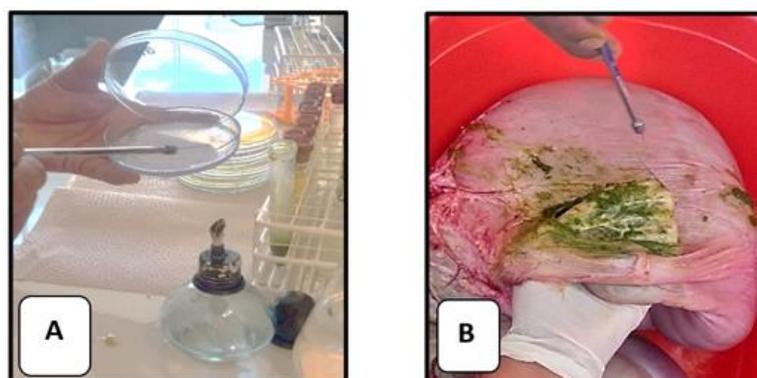


Figura 5. *Cultivo Primario de Bacterias Anaerobias a partir del Licor y Pared del Compartimento C1.*

Antes de someter a incubación las placas fueron apiladas en forma invertida dentro de las jarras de anaerobiosis, para que el microorganismo inoculado pueda colonizar el agar apropiadamente, asimismo para evitar que se contamine y que el agua de condensación caiga sobre el medio (Ver figura, 6).



Figura 6. *Placas Apiladas en Forma Invertida Antes de Someter a Incubación*

Asimismo, el cultivo bajo condiciones de anaerobiosis se realizó en jarras de anaerobiosis, empleando los sobres de BBL Gaspak como indicadores de anaerobiosis, según indicaciones dadas por (Forbes, Sahm, Weissfeld, & Trivino, 2009). Los sobres de BBL Gaspak, se activan inmediatamente después de abrir el envase de aluminio exterior, generando condiciones de anaerobiosis. Al inicio se puede observar un color blanco a azul pálido, los mismos que al estar en contacto con el oxígeno se tornan de color verde - azulado, como se puede observar en la (**Fig. 7-A**). mientras que, ya en condiciones de anaerobiosis el sobre de BBL Gaspak se vuelve color blanco, tal como se observa en la (**Fig. 7-B**). Ello nos confirma que el crecimiento del cultivo se dio en condiciones de anaerobiosis. Tras 48 horas de incubación a una temperatura de 37 °C.

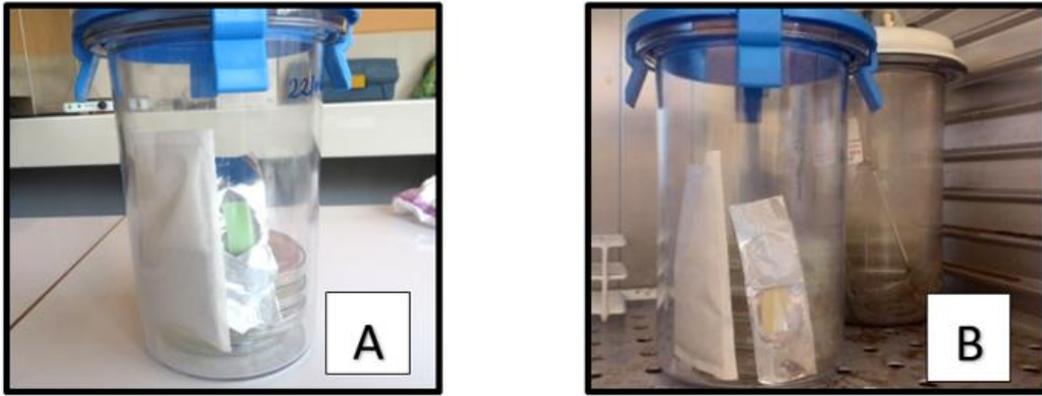


Figura 7. Jarra de Anaerobiosis, Sistema de Incubación en Anaerobiosis con el Sobre de BBL GasPak (Indicadores de Anaerobiosis)

5.4.3 *Resiembra o Repique*

Finalizado el periodo de incubación, al observarse crecimiento de microorganismos mixtos en las placas de cultivo primario, se procedió a seleccionar placas con crecimiento de colonias aisladas tomando en consideración las características morfológicas de cada colonia como tamaño, forma, borde y color (ver Figura, 8).



Figura 8. Selección de Placas de Cultivo Primario con Crecimiento de Colonias Separadas para Repique en Tubo

Realizada la selección de placas con crecimiento de colonias aisladas, con el uso de la Asa de Kollé flameada se tomó una muestra de una colonia aislada (ver, Fig. 9-A) para sembrar por picadura en la profundidad de los tubos de ensayo (Koneman et al., 2008), que contenían

medios de cultivo como Agar Sangre Columbia prerreducido, suplementado con L-cysteina (AS-Cys), Agar Brewer Anaerobic (BA) y Agar Brewer anaerobic suplementado con L-cysteina (BA-Cys) (MacFaddin, 2003), como se puede observar en la (Fig. 9-B).

Los mismos que fueron rotulados y sometidos a incubación por 48 horas a una temperatura de 37 °C, como se puede observar en la (Fig. 9-C).

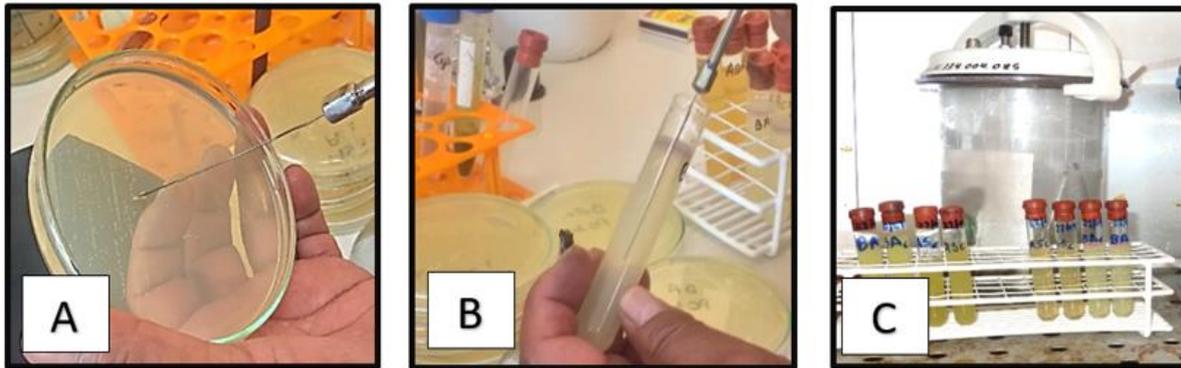


Figura 9. *Procedimiento de Resiembra a partir de Colonias Aisladas de Cultivo Primario*

5.4.4 Identificación De Bacterias Anaerobias Estrictas

La identificación de las bacterias anaerobias aisladas se realizó mediante la caracterización fenotípica y pruebas bioquímicas convencionales, basándose en la morfología de las colonias, prueba de aerotolerancia, tinción de Gram y fermentación de sustratos.

Prueba de Aerotolerancia

La prueba de aerotolerancia, se realizó con la finalidad de desestimar aquellos cultivos que presenten crecimiento en presencia de oxígeno y seleccionar aquellos cultivos que no crecen en presencia de oxígeno, de esta manera considerarlos anaerobios estrictos. El cual consistió en realizar un repique de los tubos que presentaron crecimiento a la siembra primaria y sembrarlos en placas Petri que contienen Agar Sangre suplementado con L-Cysteina, para incubarlos en condiciones de aerobiosis a 37°C por 48 horas (Cerón, 2014).

5.4.4.1 *Caracterización Fenotípica*

La caracterización fenotípica de las bacterias anaerobias aisladas se realizó mediante la observación de las características macroscópicas de las colonias aisladas y caracterización microscópica (tinción de Gram).

Características Macroscópicas de las Colonias

Para la caracterización macroscópica de las colonias seleccionadas para repique o segundo cultivo se tomó en cuenta el tamaño, forma, borde y color (Fernández et al., 2010).

Caracterización Microscópica de las Colonias por Tinción Gram

La tinción Gram se realizó a partir de los tubos recientemente incubados para repique, para verificar la morfología de las bacterias y ver el estado de pureza del cultivo. El procedimiento se realizó según indicaciones dadas por (Koneman et al., 2008)



Figura 10. *Reactivos Empleados para la tinción de Gram*

Procedimiento:

1. Con un asa de siembra se tomó una colonia para proceder a hacer el frotis correspondiente con una azada de agua destilada sobre una lámina portaobjetos.
2. Se fijó con calor 3 ida y vueltas sobre un mechero.
3. A dicha lamina se le agregó el primer colorante cristal violeta en cantidad suficiente para cubrir el frotis y se dejó actuar por 1 minuto.
4. Se lavó con el mínimo de agua para eliminar el exceso de colorante.

5. Se agregó solución de yodo denominado Lugol, en cantidad suficiente para cubrir el frotis y se dejó actuar por un minuto.
6. Se lavó con el mínimo de agua para eliminar el exceso de mordiente.
7. Posteriormente se decoloró con alcohol acetona hasta que el efluente salga incoloro, dejando actuar 10 a 20 segundos.
8. Transcurrido los 10 segundos se procedió a lavar con el mínimo de agua para eliminar el exceso de disolvente.
9. Se agregó safranina en cantidad suficiente hasta cubrir el frotis y se dejó actuar por 1 minuto.
10. Se lavó con el mínimo de agua para eliminar el exceso del colorante de contraste.
11. Finalmente se dejó secar la preparación a temperatura ambiente.
12. Posteriormente se observó al microscopio (100 X) para describir las características de los microorganismos observados.



Figura 11. *Proceso de Lavado del Exceso del Colorante Cristal Violeta*

5.4.4.2 *Caracterización Bioquímica*

Para la caracterización bioquímica convencional de las cepas aisladas se empleó las siguientes pruebas bioquímicas: la prueba de Catalasa y oxidasa, prueba de *KIA* (*kli*ger iron agar), Citrato de Simmons y medio SIM, lo que facilitó analizar los principales sustratos que degradan y fuente de energía empleada para su crecimiento.

La prueba de la Catalasa y oxidasa en el presente estudio se utilizó para desestimar aquellos cultivos positivos a Catalasa y Oxidasa, ya que estas enzimas están presentes solo en bacterias aerobias y poco frecuente en anaerobios facultativos, el procedimiento e interpretación de estas pruebas se realizó de acuerdo con (MacFaddin, 2003). (Ver Anexo 3 y 4).

Asimismo, La prueba de KIA (Kliger Iron Agar) se empleó para la determinación de la fermentación de sustratos como la glucosa y lactosa, la prueba de CS (Citrato de Simons), para determinar la utilización del citrato como fuente de carbono y SIM (Sulfuro Indol Movilidad) para la determinación de la producción de sulfuro, indol y movilidad de las bacterias en prueba. La preparación de los medios de cultivo, siembra e interpretación de los resultados se realizó de acuerdo con las indicaciones dadas por (MacFaddin, 2003), (Ver Anexo 5,6,7).

VI. RESULTADOS

En la Tabla 2 se puede apreciar que, 14 corresponden a licor y 20 a la pared del compartimento C1, haciendo un total de 34 muestras procesadas, de los cuales 22 cultivos, presentaron crecimiento tras 48 horas de incubación a 37°C en condiciones de anaerobiosis, y 12 cultivos no registraron crecimiento bacteriano. Asimismo, en la (Fig. 12-A y 12-B) se puede observar el crecimiento de la colonia a lo largo de la línea de siembra del tubo, mientras que en la (Fig. 12-C) no se observa crecimiento a lo largo de la línea de siembra del tubo.

Tabla 2

Resultados de Resiembra o Cultivo en Tubo.

Procedencia	Repique en tubo		Total
	Crecimiento	Sin Crecimiento	
Licor (LC1)	10	4	14
Pared (PC1)	12	8	20
Total	22	12	34

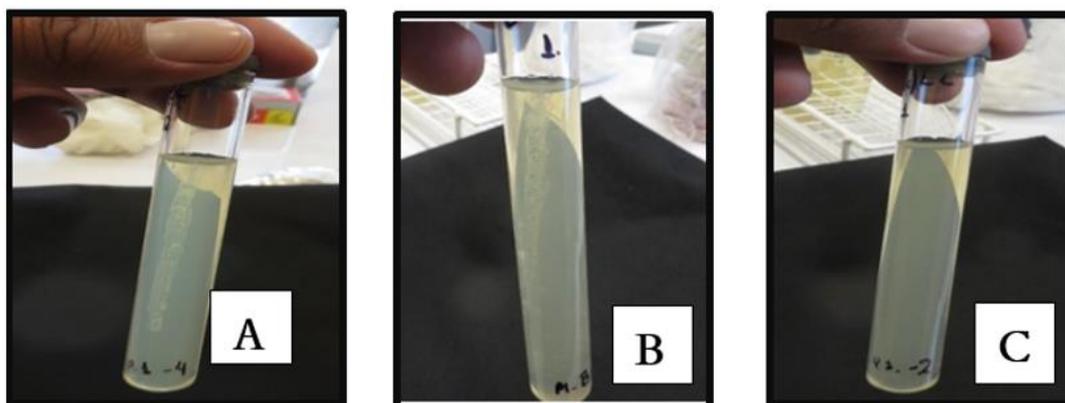


Figura 12. *Resultados de Resiembra de Bacterias Anaerobias del C1, en la Profundidad del Tubo con Medio de Cultivo Agar Brewer Anaerobic.*

6.1 Resultados del Aislamiento de Bacterias Anaerobias del Compartimento C1

En la Tabla 3, se expone los resultados de la prueba de Aerotolerancia, el cual consistió en realizar un repique de los tubos que presentaron crecimiento a la siembra primaria y sembrarlos en placas que contienen Agar Sangre suplementado con L-Cysteina, para incubarlos en condiciones de aerobiosis a 37°C por 48 horas. Con la finalidad de seleccionar los cultivos que no crecen en presencia de oxígeno, de esta manera considerarlos anaerobios estrictos. obteniendo como resultado, 7 cultivos negativos considerados anaerobios estrictos, de los cuales 4 provienen del licor y 3 de la pared del compartimento C1. En la (Fig. 13) se puede observar que los cuadrantes 14 y 15 no presentan crecimiento a diferencia del cuadrante 12 y 13 que claramente se puede observar crecimiento.

Tabla 3

Resultados de la Prueba de Aerotolerancia en Placa de Bacterias Anaerobias Aisladas del C1, en Medio de Cultivo de Agar Sangre Suplementado con L-Cysteina.

Procedencia	Prueba de Aerotolerancia en Placa			Total
	Negativo	Positivo	Sin crecimiento	
Licor (LC1)	4	6	4	14
Pared (PC1)	3	9	8	20
Total	7	15	12	34



Figura 13. *Prueba de Aerotolerancia en Placa*

6.2 Resultados de la Caracterización Fenotípica de Bacterias Anaerobias Aisladas del Compartimento C1

6.2.1 Resultados de la Caracterización Macroscópica y Microscópica

La Tabla 4. Muestra que de las 5 cepas bacterianas aisladas de contenido del compartimento C1, cuatro correspondieron a muestras procedentes del licor y uno a la pared del mismo compartimento C1, así mismo se puede apreciar que dos cepas correspondieron al aislamiento a partir de medio de cultivo de Agar Sangre Columbia, suplementado con L-cysteina (AS-Cys), otras dos cepas correspondieron al aislamiento de Brewer Anaerobic Agar (BA) y uno cepa que se aisló a partir del medio de cultivo Brewer Anaerobic Agar suplementado con L-cysteina (BA-Cys).

En cuanto a la caracterización macroscópica de las cepas aisladas de acuerdo con lo reportado en la tabla 4. Se reportaron tres cepas de tamaño mediano, dos cepas con forma redonda borde regular de color blanquecinas y uno cepa forma rizoide borde regular de color blanco, asimismo se reportó dos cepas de tamaño pequeño forma redonda con borde regular y color blanquecina.

Tabla 4

Caracterización Macroscópica y Microscópica de las Bacterias Anaerobias Aisladas del Compartimento C1 de la Alpaca

Nro.	Procedencia	Medios de Cultivo	Características Macroscópicas				Caracterización Microscópica	
			Tamaño	Forma	Borde	Color	Tinción Gram	Forma color
6	LC1	BA	Mediano	Redonda	Regular	Blanquecina	Bacilos Curvos	Gram (-)
1	LC1	AS-Cys	Pequeño	Redonda	Regular	Blanquecina	Bacilos	Gram (-)
14	PC1	AS-Cys	Mediano	Rizoide	Regular	Blanco	Bacilos	Gram (-)
4	LC1	BA	Mediano	Redonda	Regular	Blanquecina	Cocos	Gram (+)
11	LC1	BA-Cys	Pequeño	Redonda	Regular	Blanquecina	Coco – Bacilos	Gram (+)

LC1: Licor del C1 **PC1:** Pared del C1 **BA:** Brewer anaerobic **AS-Cys:** Agar sangre – cisteína

En la Tabla 5. Se expone los resultados de la tinción Gram, practicada a los cultivos que resultaron anaerobios estrictos a la prueba de Aerotolerancia presentada en la Tabla 3. Como se puede apreciar de los siete cultivos anaerobios estrictos, cinco resultaron bacterias ser anaerobias estrictas a la tinción de Gram, cuatro proceden del licor del compartimento C1, dos corresponden a bacterias Gram positivas en forma de coco y cocobacilos y 2 corresponden a bacterias Gram negativas en forma de bacilo y bacilo curvo en lo que respecta a los que provienen de la pared del compartimento C1, uno corresponde a bacterias Gram negativo en forma de bacilo, uno corresponde a la morfología de una levadura y otro no se pudo observar ninguna estructura luego de la tinción, de tal manera que solo 5 cepas aisladas corresponden a ser bacterias anaerobias estrictos tal como se reporta en la tabla 4 y 5.

Tabla 5

Resultado de la Caracterización Microscópica de las Bacterias Aisladas como Anaerobios Estrictos a partir del Compartimento C1 de la Alpaca, Mediante la Tinción de Gram

Procedencia	Tinción Gram		Total
	Gram +	Gram -	
Licor (LC1)	2	2	4
Pared (PC1)	0	1	1
Total	2	3	5

6.2.2 *Resultados de la Caracterización Bioquímicas para la Identificación de las Bacterias Anaerobias Aisladas*

De acuerdo con los resultados reportados en la tabla 6, El 100% de las cepas fueron negativas a la prueba de catalasa y oxidasa, ya que no se observó ninguna reacción o cambio al realizar ambas pruebas (Fig. 14). resultados que corresponden a bacterias anaerobias estrictas (MacFaddin, 2003). Por otro lado, todas las cepas anaerobias aisladas tuvieron la capacidad de fermentar lactosa y glucosa, ya que la superficie y profundidad del medio, el viraje cambio de un color ámbar naranja a un color ámbar amarillo en comparación con el medio control (Fig. 15-A), ello confirma que el microorganismo aislado si tiene la capacidad de fermentar lactosa y glucosa a la vez. además, que 2 cepas aisladas presentaron ruptura del medio de cultivo, como se puede observar en la (Fig. 15-B), ello indica que los microorganismos aislados son productoras de gas. Sin embargo, no se observó en ninguna de las muestras el ennegrecimiento del medio, esto nos indica que los microorganismos no tienen la capacidad de producir ácido sulfhídrico.

Mientras que, todas las cepas resultaron 100 % negativas a las pruebas de Sulfuro Indol Movilidad (SIM) y citrato de Simons (CS), tal vez porque estas pruebas están indicadas para la caracterización bioquímica de bacterias aerobias (MacFaddin, 2003). En la prueba de citrato de Simons, se utiliza el citrato como única fuente de carbono que se detecta mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. La alcalinización del medio se visualiza con el indicador azul de bromotimol que vira a azul a pH 7.6, sin embargo, en este presente estudio se puede observar que el medio permaneció de color verde (Fig. 16), ello indica que los microorganismos aislados no fueron capaces de utilizar el citrato como única fuente de carbono, por ende, resultaron negativas a la prueba.

Tabla 6

Resultados de la Pruebas Bioquímicas para la Identificación de las Bacterias Anaerobias Aisladas del compartimento C1 de la Alpaca

Nro.	Procedencia	Medios de Cultivo	Pruebas Bioquímicas						
			Catalasa	Oxidasa	KIA	SIM			Citrato de Simons
						Sulfuro	Indol	Movilidad	
6	LC1	BA	-	-	A/A	-	-	-	-
1	LC1	AS-Cys.	-	-	A/A G	-	-	-	-
14	PC1	AS-Cys.	-	-	A/A G	-	-	-	-
4	LC1	BA	-	-	A/A	-	-	-	-
11	LC1	BA-Cys.	-	-	A/A	-	-	-	-

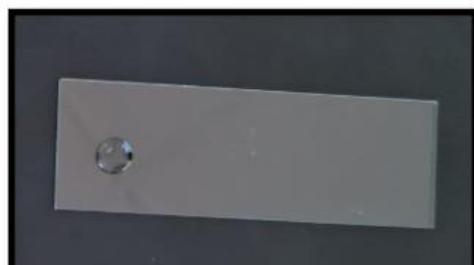


Figura 14. Resultados de la Prueba Catalasa

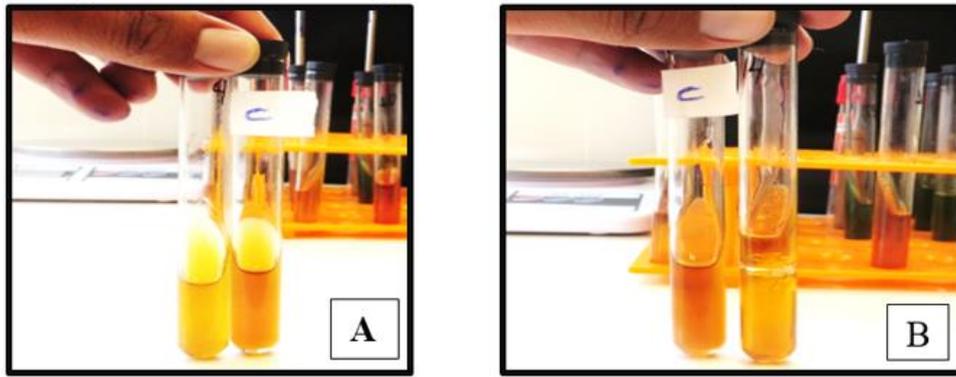


Figura 16. Resultados de la Prueba KIA



Figura 15. Resultados de la Prueba de Citrato de Simons

6.3 Resultados de la Identificación de las Bacterias Anaerobias Aisladas

Las cepas bacterianas rotulado como 4LC1BA y 11LC1BA-Cys, según sus características morfológicas, pruebas bioquímicas y patrones de fermentación de carbohidratos expuestas en la (Tabla 7), coinciden con características reportadas para *Ruminococcus sp.* (Rodríguez et al., 1996) y (Cerón, 2014) mientras que, las cepas rotuladas como 1LC1AS-Cys y 14PC1AS-Cys, según las características descritas en la (Tabla 7), corresponden a las reportadas como *Fibrobacter sp.* y la cepa rotulada como 6LC1BA, corresponde a la reportada como *Butyrivibrio sp.* (Cerón, 2014).

Tabla 7

Resultados de la Identificación de las Bacterias Anaerobias Aisladas del Compartimento C1 de la Alpaca

Nro.	Procedencia	Medios de Cultivo	Características Macroscópicas y Microscópicas de las Bacterias Aisladas													Genero	
			Tamaño	Forma	Borde	Color	Tinción Gram		Pruebas Bioquímicas								
							Forma	color	Catalasa	Oxidasa	KIA	SIM		Citrato de Simmons			
												Sulfuro	Indol		Movilidad		
6	LC1	BA	Mediano	Redonda	Regular	Blanquecina	Bacilos Curvos	Gram (-)	-	-	A/A	-	-	-	-	-	<i>Butyrivibrio sp</i>
1	LC1	AS-Cys	Pequeño	Redonda	Regular	Blanquecina	Bacilos	Gram (-)	-	-	A/A G	-	-	-	-	-	<i>Fibrobacter sp</i>
14	PC1	AS-Cys	Mediano	Rizoide	Regular	Blanco	Bacilos	Gram (-)	-	-	A/A G	-	-	-	-	-	<i>Fibrobacter sp</i>
4	LC1	BA	Mediano	Redonda	Regular	Blanquecina	Cocos	Gram (+)	-	-	A/A	-	-	-	-	-	<i>Ruminococcus sp</i>
11	LC1	BA-Cys	Pequeño	Redonda	Regular	Blanquecina	Coco - Bacilos	Gram (+)	-	-	A/A	-	-	-	-	-	<i>Ruminococcus sp</i>

Las cepas bacterianas identificadas como *Ruminococcus sp*, fueron Gram positivas, en forma de cocos y cocobacilos, como se observa en la (Fig. 17), asimismo resultaron ser positivas a la prueba de KIA, ya que tuvieron la capacidad de fermentar glucosa y lactosa como fuente de carbono (ver, tabla 7).

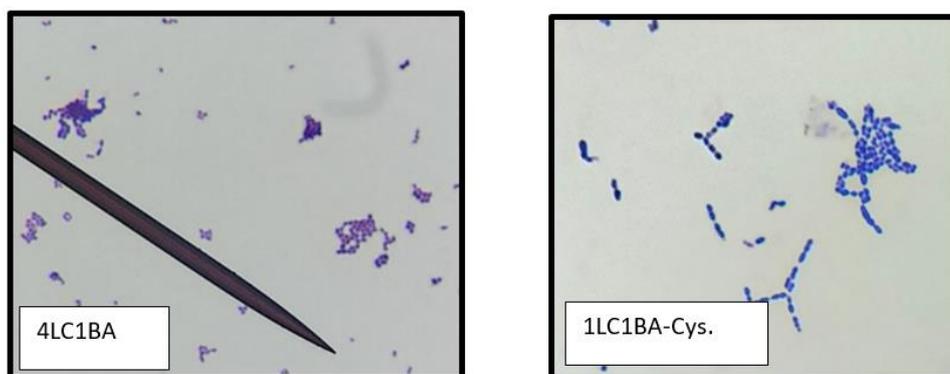


Figura 17. *Ruminococcus sp.*

Las cepas identificadas como *Fibrobacter sp*, fueron Gram negativos, en forma de bacilos como se puede observar en la (Fig. 18), además que salieron positivo a la prueba de KIA, ya que estas cepas tuvieron la capacidad de fermentar glucosa y lactosa como fuentes de carbono, adicional a ello se pudo observar la producción de gas (ver, tabla 7 y fig. 15-B).

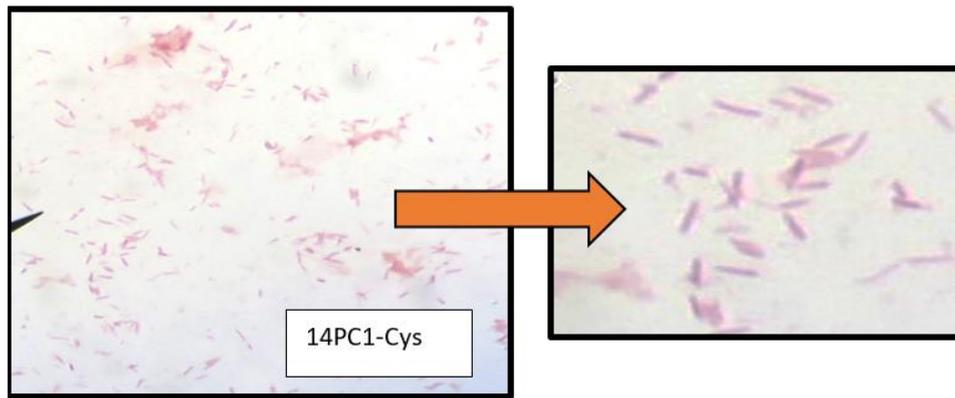


Figura 18. *Fibrobacter sp.*

Por otro lado, la cepa identificada como *Butyrivibrio sp.*, en el presente estudio, fue bacilos curvos Gram negativos, formadores de cadenas como se puede observar en la (Fig. 19), asimismo resultaron positivos a la prueba de KIA, ya que dichas cepas tuvieron la capacidad de fermentar glucosa y lactosa como fuentes de carbono (ver, tabla 7).

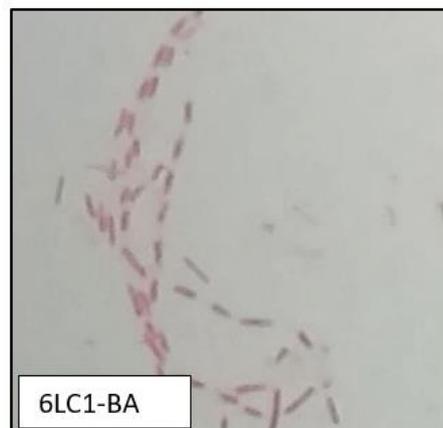


Figura 19. *Butyrivibrio sp*

VII. DISCUSIÓN

Los métodos de cuantificación bacteriana son diversos y destacan tres: número más probable, recuento de células viables en placa y el Roll-tube (vuelta en tubo). Sin embargo, los dos últimos métodos son los más usados, es decir, recuento de células viables en placa y el Roll-tube (Londoño et al., 2019). Estos métodos fueron usados con éxito en la identificación de bacterias ruminales del contenido ruminal de vacunos. En nuestro estudio el método de recuento de células viables en placa fue posible, no solamente se aisló bacterias, sino también se pudo identificar las bacterias del compartimento C1 de alpacas. Este método constituye un método alternativo cuando no es posible realizar otro método tradicional.

Por otra parte, en un estudio reportaron el aislamiento de las principales bacterias celulolíticas como: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens* a partir de líquido ruminal de ovinos y llamas alimentadas con forrajes de baja calidad con alto contenido fibroso (Ortiz, 2012), asimismo, en un estudio más reciente donde evaluaron la población de bacterias en seis alpacas macho de 1 año \pm 2 y seis ovinos machos de 1 año \pm 2, reportaron que se encontró una mayor abundancia de bacterias fibrolíticas como *Butyrivibrio*, *Selenomonas*, *Clostridium*, *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens* en el tracto digestivo de la alpaca alimentadas con dieta baja calidad (tallo de maíz) en relación con el ovino. (Xia et al., 2020); resultados similares reportamos en el presente trabajo corroborando la tipificación de *Ruminococcus sp*, *Fibrobacter sp* y *Butyrivibrio sp* conocidas como bacterias celulolíticas en muestras obtenidas a partir del contenido ruminal del compartimento C1 del tracto digestivo de 4 alpacas machos alimentadas con pastos naturales de baja calidad criadas bajo un sistema extensivo de puna húmeda.

En otro estudio reciente realizado en la provincia de Huancavelica ubicado a 3820 msnm., mencionan que los animales en condiciones pastoreo suelen presentar bacterias celulolíticas con alto potencial degradador de la celulosa al digerir biodiversidad de forrajes

fibrosos, reportaron la presencia de bacterias celulolíticas como *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes* con excelente capacidad para degradar celulosa a partir del consumo de forrajes fibrosos en los contenidos ruminales de vacuno, ovino y camélidos (Carhuapoma et al., 2022). Resultados similares reportamos en el presente trabajo corroborando la presencia de *Ruminococcus sp.*, *Fibrobacter sp.*, a partir de muestras de licor ruminal de compartimento C1 del tracto digestivo de la alpaca criadas bajo un ecosistema de puna húmeda a 4,200 msnm, donde su alimentación está basada en el consumo de biodiversidad de pastos naturales de baja calidad, presente en este ecosistema.

Las bacterias del género *Ruminococcus*, son las principales bacterias ruminales celulolíticas implicadas en la degradación de fibra en rumiantes y camellos bactriano quienes tienen una capacidad única para digerir forrajes poco digeribles por otras especies (He et al., 2018) asimismo los *Ruminococcus sp.* son microorganismos anaerobios estrictos, cocos Gram positivos, sin movimiento, lo cual ha sido reportada en ecosistemas ruminales de 2 bovinos hembras alimentadas con pasto kikuyo (Londoño et al., 2011) . En este estudio este género se caracterizó como bacterias anaerobias Gram positivas en forma de cocos y cocobacilos en alpacas machos de 3 a 4 años de edad alimentadas con pastos naturales de baja calidad, resultados que coinciden con lo reportado por ambos autores. Además, que estos microorganismos tuvieron la capacidad fermentadora de glucosa y lactosa, como fuente de carbono, pero que resultaron negativas a la prueba de catalasa, oxidasa y citrato de Simmons resultados que coinciden con lo reportado con (Rodríguez et al., 1996).

Sin embargo, estudios de identificación bacteriana realizada mediante pruebas bioquímicas convencionales a partir del contenido ruminal en vacunos reportaron que el género de *Ruminococcus sp.*, no fueron capaces de degradar celulosa, pero metabolizaron citrato y produjeron enzima catalasa (Guerrero, 2011). Resultados no coinciden con lo reportado en ese trabajo, debido a que en el presente trabajo reportamos que este género si fue capaz de degradar

glucosa, mas no tuvo la capacidad de metabolizar citratos, ni produjeron la enzima catalasa. Cerón, (2013) indica que el *Ruminococcus speciens* según el tipo de cepa pueden variar en su capacidad de utilizar glucosa, arabinosa, lactosa, manosa, manitol. Asimismo, Rodríguez et al., (1996) menciona que, las pruebas de motilidad negativa, asociadas a la estricta anaerobiosis y la incapacidad de reducir nitratos, aportaron las primeras señales bioquímicas a la identificación de las cepas aisladas como bacterias celulolíticas ruminales. Nuestros hallazgos se podrían fundamentar a estos conceptos.

En segundo lugar, se aisló y tipificó el género *Fibrobacter sp.*, conocidas bacterias anaerobias Gram negativas, móviles, en forma bacilar, aunque puede presentarse en forma de cocos y cocobacilos, no formadoras de esporas. Considerado una de las principales bacterias degradadoras de celulosa, además de degradar pectina, xilano, lactosa y son productores de succinato como producto final de fermentación (Rodríguez, 2013). En este estudio esta genero se tipifico como bacterias Gram negativas en forma de bacilos con capacidad degradadora de glucosa y lactosa, pero no metabolizaron el citrato como única fuente de carbono, resultados que coinciden con lo reportado por Londoño et al. (2011) y Rodríguez et al. (1996) Sin embargo, no coinciden con lo reportado por Guerrero (2011) quién menciona en su estudio que este género no fue capaz de fermentar glucosa, ni lactosa y emplearon citrato como única fuente de carbono, tal vez porque estas pruebas están indicadas para la identificación bioquímica de bacterias aerobias (MacFaddin, 2003) .

Existen estudios previos donde reportaron que el género *Butyrivibrio sp.*, se encontraba en mayor abundancia en tres sitios del tracto gastrointestinal (C1, duodeno, yeyuno) de las alpacas alimentadas con heno de alfalfa en relación con las alpacas alimentadas con heno de hierbas (íleon, ciego, intestino grueso); (Carroll et al., 2019). Asimismo, estos microorganismos están correlacionados con la alta concentración de ácido butírico como producto de la fermentación (Wang et al., 2016). Independientemente de la técnica empleada

para su identificación estos microorganismos requieren condiciones de anaerobiosis para su crecimiento, bacilos Gram positivas, aunque se tiñen como Gram negativas ligeramente curvos, pudiendo encontrar en forma aislada, en pares o formando cadenas, con la capacidad de fermentar glucosa, celobiosa, maltosa, xilano, pectina y son productores de ácido butírico como principal producto de fermentación (Cerón,2013). Resultados similares fueron hallados en el presente trabajo, donde el *butyrivibrio* se caracterizó como Gram negativos, formadores de cadenas, con capacidad de fermentar glucosa como fuente de carbono con la excepción de que en este trabajo este género no presentó motilidad, tal vez por el tipo de medio empleado para su crecimiento.

VIII. CONCLUSIONES

Se aisló y caracterizó cinco cepas de bacterias anaerobias del compartimento C1 del tracto digestivo de cuatro alpacas macho.

Las bacterias aisladas fueron: *Ruminococcus sp.* (2), *Fibrobacter sp.* (2) y *Butyrivibrio sp.*.

IX. RECOMENDACIONES

Se recomienda usar técnicas de biología molecular como PCRq en tiempo real y análisis de secuencias del gen 16s ARNr para una identificación definitiva de las bacterias anaerobias presentes en el compartimento C1 de la alpaca.

Tomar en cuenta las bacterias aisladas y en el futuro usarlas como aditivo biológico fuente de bacterias y enzimas para la nutrición de los CSA.

Se recomienda realizar este tipo de trabajo en diferentes épocas del año, ya que la disponibilidad de pastos puede variar.

X. REFERENCIAS

- Alcalá, L., Betriu, C., García, J., & Reig, M. (2004). Procedimientos en Microbiología Clínica. [https://www.seimc.org/contenidos/documentoscienificos/procedimientosmicrobiologia\(seimc-procedimientomicrobiologia16.pdf](https://www.seimc.org/contenidos/documentoscienificos/procedimientosmicrobiologia(seimc-procedimientomicrobiologia16.pdf).
- Alfaro, S. (2018). Producción de alpacas alternativa rentable para las familias alto andinas de la zona centro de Ayacucho. Tesis de pregrado de la facultad de ciencias económicas [UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS]. https://centroderecursos.cultura.pe/sites/default/files/rb/pdf/produccionde_alpacas.pdf.
- Avilés, D., Montero, M., & Barros-Rodríguez, M. (2018). Los camélidos Sudamericanos: productos y subproductos usados en la región andina. *Actas iberoamericanas en conservación animal*, 11, 30-38.
- Bustinza, V. (2001). *La alpaca, crianza, manejo, mejoramiento*. 343 p.
- Cahuana, F. (2012). *Efectos de la actividad enzimática de fibrobacter succinogens sobre celulosa obtenida del papel periódico*. Tesis de pregrado de la facultad de zootecnia [UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CENTRO DEL PERÚ].
- Carhuapoma, V., Auqui, G., Valencia, N., Gonzales, T., Guillen, H., & Esparza, M. (2022). Bacterias fribrolíticas aisladas del rumen de alpaca, ovino y vacuno con capacidad biodegradadora de celulosa. *Revista científica de la facultad de ciencias veterinarias*, XXXII, 1-7. <https://doi.org/10.52973/rcfcv-e32094>.
- Carrica, M., Lendez, P., P, C. M., Zimmermann, B., Ghezzi, M., Díaz, M. del C., Contreras, L., Mendoza, G., Castro, A., & Barbeito, C. (2019). Desarrollo y diferenciación de la túnica muscular durante la ontología temprana del estómago de la alpaca (vicugna pacos). VII Jornada de difusión de la investigación y extensión, 3-4.

- <https://www.fcv.unl.edu.ar/investigacion/wp-content/uploads/sites/7/2018/11/2-CB-carricallia-Desarrollo.pdf>.
- Carroll, C., Olsen, K. D., Ricks, N. J., Dill-McFarland, K. A., Suen, G., Robinson, T. F., & Chaston, J. M. (2019). Bacterial communities in the alpaca gastrointestinal tract vary with diet and body site. *Frontiers in Microbiology*, *10* (JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03334>.
- Ccanccapa, K. (2020) *Efecto de la transferencia de líquido del estómago anterior de alpacas en el desarrollo corporal de crías de alpaca suri*. Tesis de pregrado de la FMVZ. [UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ANTIPLANO DE PUNO].
- Cerón, M. (2014). *Estudio de la diversidad microbiana del compartimento C1 del sistema digestivo de la llama (lama glama)*. Tesis doctoral de la facultad de Farmacia y Bioquímica [UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES].
- Cerón, M. (2015). Diversidad microbiana del estómago de los camélidos sudamericanos. *VII Congreso Mundial en camélidos sudamericanos*.
- Cruz, L. (2018). *Parámetros Genéticos de Caracteres Funcionales y Secundarios en Alpacas*. Tesis doctoral de la facultad de veterinaria [UNIVERSIDAD COMPUTENSE].
- Fernández, A., García de la fuente, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>.
- Forbes, B., Sahn, D., Weissfeld, A., & Triveno, E. (2009). *Bailey Scott Diagnóstico Microbiológico* (12 th ed.). Editorial Médica Panamericana S.A.
- Fraga, M., Perelmuter, K., Valencia, M., Cajarville, C., & Zunino, P. (2012). Caracterización del microbiota bacteriano ruminal de un bovino a pastoreo mediante técnicas clásicas

- e independientes de cultivo. *VETERINARIA (Montevideo)*, 49, 26-38.
<https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/218>.
- Guerrero, A. (2011). *Aislamiento de bacterias ruminales degradadoras de celulosa*. Tesis de pregrado de la FCAA [UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA].
- He, J., Yi, L., Hai, L., Ming, L., Gao, W., & Ji, R. (2018). Characterizing the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract segments of the Bactrian camel. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18298-7>.
- (INEI). (2013). Resultados definitivos IV Censo Nacional Agropecuario 2012.
- Koneman, E., Winn, W., Allen, S., Janda, W., Tenover, G., & Tenover, G. (2008). *Koneman Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas en Color* (6 th ed.). Editorial Médica Panamericana S.A.
- Llamas, J. (2011). *Aislamiento e identificación de la microflora bacteriana ruminal en vacas Holstein alimentadas con subproductos de cervecería*. Tesis de maestría [UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO].
- Llamas, J., Charles, A., Fuentes, J., López, R., García, R., Rodríguez, R., & Nevárez, G. (2013). Aislamiento e identificación de la microflora bacteriana ruminal en vacas Holstein, alimentadas con subproductos de cervecería. *Agraria*, 10(2), 27-32.
[https://www.redinnovagro.in/docs/Revista_Agraria_vol\(10\)_No\(2\).pdf](https://www.redinnovagro.in/docs/Revista_Agraria_vol(10)_No(2).pdf).
- Londoño, A., Fernández, J., Molina, L., Polanco, D., & Gutiérrez, L. (2011). Cuantificación de bacterias celulolíticas anaerobias provenientes del rumen de ganado bovino: comparación de tres técnicas. *Hechos microbiolog.*, 2(1), 51-59.
https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/10440/1/LondonoAndres_2011_CuantificacionBacteriasGanado.pdf.

- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G., & Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 3, 10-18.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2014/ir141b.pdf>
- MacFaddin, J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* (3rd ed). Editorial Médica Panamericana S.A.
- Mamani, R., Gonzáles, M., Condori, N., Huacani, F., & Checalla, V. M. (2021). Parámetros productivos en camélidos sudamericanos. *Manglar*, 18(4), 403-409.
<https://doi.org/10.17268/manglar.2021.052>.
- (MINAGRI). (2019). Potencial productivo y comercial de la alpaca.
<https://www.minagri.gob.pe/portal/analisis-economico/analisis-2019>.
- Ortiz, A. (2012). *Capacidad digestiva del contenido ruminal de la oveja (Ovis aries) y Llama (Lama glama)*. Tesis de maestría [UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES].
- Quinn, P., Markey, B., Carter, M., Donnelly, W., & Leonard, F. (2005). *Microbiología y enfermedades infecciosas*. Editorial ACRIBIA, S.A.
- Raggi, L., & Fernando, G. (1998). Avances en fisiología y adaptación de camélidos sudamericanos. *Avances en ciencias veterinarias*, 13(1), 1-13.
<https://estudiosdeadministracion.uchile.cl/index.php/ACV/article/view/4806/10989>
- Ríos, N. (2008). *Aislamiento de cepas anaerobias termófilas productoras de celulosas y hemicelulosas, provenientes de la región altiplánica de Bolivia, implicadas en la producción de etanol mediante técnicas de cultivo y aislamiento tradicionales y no tradicionales*. Tesis de pregrado de la FCFB [UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS].
- Rodríguez, C. (2012). *Identificación de la microflora bacteriana ruminal de la alpaca (vicugna pacos) mediante análisis del GEN 16S RDNA*. Tesis de pregrado de la facultad de

Medicina Veterinaria [UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS].

- Rodríguez, F., Díaz, T., Mackenzie, G., Guativa, L., & Afanador, C. (1996). Aislamiento, patrón de fermentación de carbohidratos y caracterización morfológica de bacterias celulolíticas del rumen de bovinos alimentados con heno de raigrás en Colombia. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 1 (1), 23-28. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449953017004>.
- Roque, B. (2012). Nutrición animal. 203 p.
- San Martín, F. (1994). Avances y alternativas de alimentación para los camélidos. *Investigaciones pecuarias*, 7. https://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/veterinaria/v07_n2/avancesya.htm.
- San Martín, F., & Olazabal, J. (2005) Nutrición y alimentación en camélidos sudamericanos domésticos. Manual de técnico alpaquero (pp. 55-68).
- Schlegel, H. (1997). *Microbiología general* (EDICIONES OMEGA, S.A).
- Stanchi, N. (2007) *Microbiología veterinaria* (INTER-médica).
- Thatcher, F., & Clarck, D. (1973). *Análisis microbiológico de los alimentos*. Editorial Acribia.
- Wang, W., Li, F., Wang, X., Liu, T., Nian, F., Yue, X., Li, F., Pan, X., La, Y., Mo, F., & Li, B. (2016). Effects of early feeding on the host rumen transcriptome and bacterial diversity in lambs. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep32479>.
- Xia, C. Q., pei, C.X., Huo, W. J., Zhang, C. X., & Ren, Y. S. (2020). Forestomach fermentation and microbial communities of alpacas (*Lama pacos*) and sheep (*Ovis aries*) fed maíz stalk-based diet. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 29(4), 323-329. <https://doi.org/10.22358/jafs/131230/2020>.

Zevallos, J. (2020). *Predicción de la proteína dietaria con espectrometría de infrarrojo cercano en heces de Llama*. Tesis de pregrado de la facultad de zootecnia (UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA).

XI. ANEXOS

ANEXO 1

AGAR BASE SANGRE COLUMBIA

Medio de cultivo empleado para el aislamiento y el cultivo de microorganismos exigentes de diferentes especies.

COMPOSICION	
Peptona especial	23 g.
Almidón	1 g.
Cloruro de sodio	5 g.
Agar	10 g.

Preparación

Añadir 39 g a 1 litro de agua destilada. Llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. enfriar a 50 °C y agregar un 5 % de sangre desfrinizada-esteril. Homogenizar y distribuir en placas Petri o tubos esterilizados.

Siembra

En superficie estriar directamente el material en estudio.

Incubación

El tiempo, la temperatura, y la atmósfera de incubación, dependerán del microorganismo que se requiera recuperar.

Bacterias anaerobias: en anaerobiosis a 33-37 °C durante 24-48 horas.

ANEXO 2

AGAR BREWER ANAEROBIC

El agar anaeróbico BREWER se utiliza para las pruebas de aislamiento y sensibilidad de bacterias anaeróbicas y microaerófilos. Organismos y estudio de la morfología colonial.

COMPOSICION DE AGAR BREWER	
Triptona	5 g.
Peptona Proteasa	10 g.
Extracto de Levadura	5 g.
Dextrosa	10 g.
Cloruro de Sodio	5 g.
Agar	20 g.
Tioglicolato de Sodio	2 g.
Sulfoxitalo de Formaldehido de Sodio	1 g.
Resarzurina	0.002 g.
pH final: 7.2°C en 25°C	

Preparación

Suspender 58g del polvo en 1 litro de agua purificada o destilada, mezclar bien. Calentar con agitación frecuente y herir por 1 minuto para disolver completamente el polvo.

Esterilizar en una autoclave a 121 °C por 15 min a 15 lbs.

Siembra

Inocular por estría o frotis, en la superficie del medio una muestra obtenida correctamente, para obtener colonias aisladas.

Incubación

Incubar a 35°C ± 2°C y examinar a las 24 horas, si las placas de incuban en una cámara anaeróbica, examinar a las 48 horas, si se incuban las placas en un jarra o bolsa anaeróbica.

ANEXO 3

PRUEBA DE LA CATALASA

Esta prueba se emplea para comprobar la presencia de la enzima catalasa.

Procedimiento

Método del portaobjetos

- Con un asa de inoculación, tomar una colonia pura del medio de cultivo de 18 a 24 horas de incubación y colocar sobre el portaobjetos de vidrio limpio.
- Agregar una gota de H₂O₂ al 30% sobre la colonia pura colocada en el portaobjetos con un gotero o pipeta Pasteur.
- Finalmente observar la reacción inmediatamente.

Interpretación de resultados

Positivo: Formación de burbuja (liberación de gas).

Negativo: No se observa ninguna reacción.

ANEXO 4

PRUEBA DE LA OXIDASA

Esta prueba se empleó para determinar la presencia de las enzimas oxidasas en las colonias aisladas, para ello se utilizó las tiras impregnadas con reactivo para la prueba de la oxidasa.

Procedimiento

- Coger la tira y dejar que alcance la temperatura ambiente
- Con un asa de inoculación, coger una colonia bien desarrollada del medio de cultivo y extender la colonia por la zona reactiva de la tira.
- Observar los cambios ocurridos

Interpretación de resultados

Positivo: Color azul

Negativo: no hay cambio de color.

Se considera positivos a los que viran a azul antes de los primeros 30 segundos, transcurrido este tiempo todas las cepas, incluso las negativas acaban virando a gris azulado.

ANEXO 5

PRUEBA KIA

Esta prueba se utilizó para la diferenciación de enterobacterias, en este estudio se empleó para la diferenciación de bacterias anaerobias ruminales, capaces de fermentar de hidratos de carbono como la glucosa y lactosa, asimismo la producción de ácido sulfhídrico.

Fundamento

En el medio de cultivo, la peptona de carne y la tripteína, aportan los nutrientes adecuados para el crecimiento bacteriano. La lactosa y la glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el citrato de hierro y amonio es la fuente de iones Fe^{3+} , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. El agar es el agente solidificante.

La fermentación de los azúcares produce ácidos que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

COMPOSICIÓN	
kligler Iron Agar	
Extracto de carne	3 g.
Extracto de levadura	3 g.
Peptona	15 g.
peptona proteosa	5 g.
Lactosa	10 g.
Dextrosa	1 g.
Sulfato de hierro	0.2 g.
Cloruro de sodio	5 g.
Tiosulfato de sodio	0.3 g.

Agar	12 g.
Rojo fenol	0.024 g.
pH final 7.4 en 25 °C	

Preparación del Medio de Cultivo

Suspender 55 gramos en 1000 ml de agua destilada fría y calentar con agitación frecuente, hervir para disolver completamente el medio, esterilizar en autoclave por 15 minutos de presión a una temperatura de 121 °C.

Enfriar y dejar solidificar en posición inclinada (pico de flauta profundo).

Siembra

Con una aguja de inoculación tomar una colonia pura del medio de cultivo, para inocular por picadora en la profundidad del tubo y extendiéndola sobre la superficie de este.

Incubación

En aerobiosis, a 22-37°C, durante 18 a 24 horas.

Interpretación de los resultados

REACCION	SUPERFICIE/ PICO	PROFUNDIDAD/ FONDO	FERMENTACION DE HIDRATO DE CARBONO
Alc/A	Alcalina/ Rojo	Acida/Amarillo	El microorganismo solo fermenta glucosa
A/A	Acida/Amarillo	AcidaAmarillo	El microorganismo fermenta glucosa y lactosa
Alc/Alc	Alcalina	Alcalina	El microorganismo no es fermentador de azucares
La presencia de burbujas o la ruptura del medio de cultivo indican que el microorganismo produce gas.			
El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.			

ANEXO 6

PRUEBA DE CITRATO DE SIMMONS

Este medio de cultivo empleado para la diferenciación de enterobacterias, en el presente estudio se empleó para determinar la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono por parte de las bacterias anaerobias ruminales aisladas.

Fundamento

En el medio de cultivo, el fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano.

Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino y el agar es el agente solidificante.

El medio de cultivo es diferencial en base a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad.

El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarbóxico.

El desdoblamiento del citrato genera progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio entonces vira al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa.

COMPOSICIÓN DE CITRATO DE SIMONS	
Sulfato de magnesio	0.2 g.
Fosfato dihidrogeno de amonio	1 g.
Fosfato dipotásico	1 g.
Citrato de sodio	2 g.
Cloruro de sodio	5 g.
Agar	15 g.
Azul de bromotimol	0.08 g.
pH final 6.8 en 25 °C	

Preparación del medio de cultivo

Suspender 24,2 gramos en 1000 ml de agua fría recién destilada y calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición durante 1 o 2 minutos para disolver el medio por completo. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión a una temperatura de 121 °C.

Siembra

Inocular por estría en la superficie del medio de cultivo.

Incubación

En aerobiosis, a 33-37°C durante 24-72 horas.

Interpretación De Los Resultados

Positivo: Crecimiento bacteriano con un intenso color azul en el pico de flauta.

Negativo: Ausencia de crecimiento y permanencia del color verde del medio de cultivo.

ANEXO 7

PRUEBA DE MEDIO SIM

Este medio de cultivo se utilizó para verificar si las bacterias anaerobias aisladas tienen movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno.

Fundamento

Medio de cultivo en el cual la tripteína y la peptona aportan nutrientes para el desarrollo microbiano. El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas y particularmente de la tripteína y puede ser metabolizado por algunas bacterias para formar indol.

En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovac's, para originar un compuesto de color rojo.

A partir del tiosulfato de sodio los microorganismos pueden generar ácido sulfhídrico que reacciona con el hierro presente formándose un compuesto de color negro.

El agar es el agente solidificante y a esta concentración le otorga al medio la propiedad de ser semisólido, condición necesaria para detectar movilidad, que se evidencia por el enturbiamiento del medio o por crecimiento que difunde más allá de la línea de siembra del microorganismo en estudio.

COMPOSICIÓN DEL MEDIO SIM	
Peptona	30 g.
Extracto de carne	3 g.
hierro peptonizado	0.2 g.
Tiosulfato de sodio	0.025 g.
Agar	3 g.

pH final 7.3 en 25 °C.

Preparación del Medio de Cultivo

Suspender 36 gramos en 1000 ml de agua destilada y calentar con agitación constante, llevar a ebullición por 1 a 2 minutos para disolver el medio completamente. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión a una temperatura de 121 °C.

Siembra

Con una aguja de inoculación recta, en la profundidad del tubo inocular por punción la colonia pura aislada, abarcando los dos tercios de profundidad del medio de cultivo desde la superficie.

Incubación

En aerobiosis a 33-37°C, durante 18 – 24 horas.

Interpretación de los Resultados

Observar la movilidad y el color del medio de cultivo. Luego realizar la prueba de indol.

Movilidad		Producción de ácido sulfhídrico		Prueba de Indol	
Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Presencia de turbidez o crecimiento más allá de la siembra.	Crecimiento solamente en la línea de siembra.	Ennegrecimiento del medio de cultivo a lo largo de la línea de siembra o en todo el tubo.	El medio permanece sin cambio de color.	Color rojo	El color del reactivo permanece incoloro-amarillento.

- Para la prueba de indol: agregar al medio de cultivo 3 a 5 gotas de reactivo de Kovacs.